

**Università di Pisa**

**Dottorato di ricerca in: Igiene e qualità degli  
alimenti di origine animale nei paesi del bacino  
mediterraneo.**

**Tesi di dottorato**

**Strategie nutrizionali per l'arricchimento naturale  
del latte ovino con acido linoleico coniugato e  
omega-3: l'impiego dei semi di lino estrusi.**

Tutor

Prof. Pierlorenzo Secchiari

Dottorando

Dott.ssa Alice Pollicardo

Anno accademico 2008/09

# **Introduzione..... 5**

<b>1 I LIPIDI DEL LATTE DEI RUMINANTI.....</b>	<b>9</b>
1.1 I TRIGLICERIDI DEL LATTE .....	12
1.2 I FOSFOLIPIDI DEL LATTE .....	14
1.3 GLI ACIDI GRASSI DEL LATTE.....	14
<b>2 ASSUNZIONE DI LIPIDI CONTENUTI NEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI ED IMPLICAZIONI SALUTISTICHE. ....</b>	<b>17</b>
2.1 ASSUNZIONE DI ACIDI GRASSI SATURI (SFA) ED IMPLICAZIONE SALUTISTICHE .....	19
2.2 ASSUNZIONE DI COLESTEROLO ED IMPLICAZIONI IN TERMINI DI SALUTE UMANA. .	21
2.3 ASSUNZIONE DI ACIDI GRASSI <i>TRANS</i> ED IMPLICAZIONI SALUTISTICHE .....	23
2.4 ASSUNZIONE DI CLA E LORO RUOLO BIOLOGICO.....	26
2.5 ASSUNZIONE DI ACIDI GRASSI MONOINSATURI (MUFA) E RIPERCUSSIONI SULLA SALUTE UMANA.....	33
2.6 RUOLO BIOLOGICO DEGLI GRASSI POLINSATURI (PUFA).....	35
2.7 RUOLO BIOLOGICO DEGLI ACIDI GRASSI A CATENA RAMIFICATA (BCFA).....	38
<b>3 I LIPIDI DEL LATTE: ORIGINE E METABOLISMO .....</b>	<b>39</b>
3.1 METABOLISMO LIPIDICO NEL RUMINE .....	39
3.1.1 La lipolisi.....	40
3.1.2 La Bioidrogenazione.....	41
3.1.3 Sintesi degli acidi grassi microbici .....	43
3.1.4 Bilancio lipidico nel rumine .....	45
3.2 LA SINTESI MAMMARIA DEGLI ACIDI GRASSI.....	46
3.3 LA BIOSINTESI DEI CLA.....	49
3.3.1 La Sintesi ruminale dei CLA .....	49
3.3.2 Sintesi dei CLA a livello dei tessuti. ....	52
3.4 IL COLESTEROLO: STRUTTURA CHIMICA, BIOSINTESI E DEGRADAZIONE.....	55
<b>4 STRATEGIE IMPIEGATE PER LA MODIFICAZIONE DELLA FRAZIONE LIPIDICA DEL LATTE OVINO.....</b>	<b>57</b>
4.1 INTEGRAZIONE DELLA DIETA CON FONTI LIPIDICHE ED EFFETTI SULLA QUANTITÀ E SULLA QUALITÀ DEL LATTE. ....	58
4.2 L’IMPIEGO DI FONTI LIPIDICHE NON PROTETTE NELLA DIETA DI OVINI DA LATTE ..	63

4.3	IMPIEGO DI FONTI LIPIDICHE RUMINO-PROTETTE NELL'ALIMENTAZIONE DELLE PECORE.....	64
4.4	TIPOLOGIA DI FONTI LIPIDICHE IMPIEGABILI PER LA GRASSATURA DELLE RAZIONI DEGLI OVINI DA LATTE E RIPERCUSSIONI IN TERMINI DI MODIFICAZIONE DELLA COMPONENTE LIPIDICA. ....	66
4.5	GRASSATURA DELLA DIETA A MEZZO DI GRANELLE ED OLI. ....	67
4.6	ARRICCHIMENTO LIPIDICO DELLA DIETA DEGLI OVINI DA LATTE A MEZZO DEL PASCOLO.....	68
4.7	EFFETTI DELL'INTEGRAZIONE CON SEMI DI LINO SUL PROFILO ACIDICO DEL LATTE DI PECORA .....	72
4.8	EFFETTI DELL'ALIMENTAZIONE SUL CONTENUTO DI CLA NEL LATTE.....	75
5	SCOPO DEL LAVORO.....	80

## **Materiali e metodi ..... 81**

6	AZIENDA, ANIMALI E DISEGNO SPERIMENTALE .....	81
7	ANALISI.....	83
7.1	ANALISI STATISTICA .....	87

## **Risultati e discussione..... 89**

8	COMPOSIZIONE DEGLI ACIDI GRASSI DEL LATTE .....	89
9	CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE DEL LATTE .....	108
10	- TRASFERIMENTO DEGLI ACIDI GRASSI DAL LATTE AL FORMAGGIO .....	109
11	CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI DEL FORMAGGIO.....	114
12	EFFETTI DELLA ASSUNZIONE DI FORMAGGIO ARRICCHITO NELL'UOMO .....	124

## **Conclusioni..... 127**

## **Bibliografia citata e di riferimento..... 130**

*Per Marcello senza il quale non.*

# Introduzione

---

Recenti avanzamenti conoscitivi nelle scienze di base ed applicate hanno permesso di evidenziare con sufficiente chiarezza le interrelazioni esistenti tra alimentazione e salute pubblica, ossia la capacità degli alimenti di essere insieme veicolo di nutrienti e strumento di prevenzione di alcune specifiche patologie. Per questo motivo parlare oggi di grassi di origine animale e, nello specifico, della matrice lipidica dei prodotti lattiero caseari ovini, significa inserirsi perfettamente al centro delle dialettica mondiale relativa alla definizione delle politiche d'indirizzo circa l'informazione del consumatore e la tutela della salute pubblica. In effetti, da circa 20 anni i più importanti centri di ricerca mondiali si stanno occupando del ruolo svolto dai lipidi di origine animale nella induzione/prevenzione delle, cosiddette, patologie moderne intimamente connesse alla cattiva alimentazione, a scorretti stili di vita e, più in generale, alla progressiva e radicale modificazione della dieta dell'uomo occidentale. La radicale modificazione della dieta dei consumatori occidentali, verificatasi a seguito della rivoluzione industriale, sembra aver indotto l'affermarsi di patologie legate alla scorretta alimentazione quali la sindrome metabolica (SM), il cancro al colon, le malattie cardio-vascolari (CHD), l'aterosclerosi e l'obesità anche infantile. Tali patologie, oltre a preoccupare il legislatore e gli enti preposti alla salvaguardia e tutela del diritto alla salute del cittadino, costituiscono un aggravio della spesa pubblica in termini di cure richieste ed erogate al crescente numero di soggetti bisognosi. Al fine, quindi, di tutelare la salute pubblica e, concomitantemente, di contenere la spesa sanitaria, nelle nazioni più sviluppate sono stati promossi programmi di ricerca atti ad individuare le cause scientificamente correlabili con le patologie in questione, anche a livello di comportamenti alimentari scorretti. In questo senso, è da leggersi la

promulgazione, ad opera della CE, del Libro Bianco<sup>1</sup> relativo alle strategie integrate necessarie a definire e diffondere precise linee guida in materia di corretta alimentazione, sovrappeso, obesità e patologie correlate. In effetti, analisi statistiche recenti circa l'incidenza di patologie quali l'obesità, l'aterosclerosi cardiaca (cardiopatía ischemica) e l'ipertensione hanno messo in evidenza che circa il 30 % dei cittadini italiani è affetto da tali disturbi singolarmente e/o in modo associato. Il diffondersi di tali patologie sembra poter essere spiegato proprio in funzione di comportamenti alimentari e stili di vita scorretti. In particolar modo è stato evidenziato dalla ricerca di settore lo stretto legame esistente tra assunzione di dosi elevate, per lunghi periodi di tempo, di colesterolo, acidi grassi saturi (SFA) e di alcuni acidi grassi *trans* e l'insorgenza delle patologie sopracitate. In effetti tali patologie, per quanto diverse in termini sintomatologici, sono tutte accomunate dall'essere ascrivibili a forme più o meno spinte di dismetabolie lipidiche. Il fatto che l'assunzione di certi tipi di acidi grassi e/o classi lipidiche veicolate dai prodotti di origine animale possa porsi come fattore predisponente l'insorgenza delle CHD, non deve tradursi automaticamente nella messa al bando di questi alimenti, ma piuttosto dovrebbe indurre ad un loro consumo ragionato, calibrato in funzione da un lato del fabbisogno calorico medio giornaliero dell'uomo e dall'altro sulla quantificazione effettiva dei nutrienti ad azione negativa. E' innegabile, infatti, che i prodotti di origine animale e, quindi, anche quelli lattiero-caseari siano veicolo di importanti nutrienti e siano annoverabili tra gli alimenti a più alta densità calorica. Ciò a dire che a parità di quantità, i prodotti di origine animale ed in particolare quelli derivati dai ruminanti, sono in grado mediamente di apportare un più alto contenuto percentuale in proteine ad alto valore biologico, calcio, lipidi ad attività biofunzionale, sali minerali, vitamine, rispetto alla stessa quantità di un prodotto di origine vegetale. In particolar modo il latte delle diverse specie di ruminanti è il veicolo d'elezione del calcio in forma di fosfato organico prontamente

---

<sup>1</sup> White paper on a strategy for Europe nutrition, overweight, obesity and related health issue; Bruxelles 30/05/2007, CE.

assimilabile, di selenio, di fosforo e di proteine ad alto valore biologico. Ciò fa sì che tale alimento sia da considerarsi completo e prezioso per la dieta dell'uomo in genere e per quella di consumatori con particolari esigenze nutrizionali, quali i neonati e i bambini in fase di accrescimento, gli anziani e le donne prossime alla meno pausa. In effetti, è noto da tempo l'effetto positivo derivante dall'assunzione di latte e prodotti lattiero caseari relativamente alla prevenzione dell'osteoporosi e di alcune forme di cancro al colon (Hasler, 1998; Secchiari et al., 2002). Tuttavia, dato che il latte è veicolo anche di alcune classi di lipidi che, se assunte in eccesso, sono un fattore di rischio per l'insorgenza di patologie a danno dell'apparato cardiovascolare (German et al., 1997) è d'obbligo operare una rassegna circa lo stato dell'arte relativo al ruolo svolto dalle diverse fonti lipidiche inserite nella dieta dell'uomo, circa le diverse classi di lipidi interessate dal fenomeno in questione e relativamente alle quantità oltre le quali le classi di lipidi chiamate in causa sembrano essere effettivamente dannose per la salute del consumatore.

In effetti, per molto tempo si è assistito ad una forte opera di demonizzazione dei prodotti di origine animale proprio in funzione del loro importante contenuto in lipidi, che gli è valso d'essere tacciati come alimenti a rischio per la salute dell'uomo. Tale approccio agli alimenti di origine animale sembra essere errato sia in termini concettuali, che scientifici. In effetti, non si deve dimenticare che l'uomo moderno si è evoluto con gli alimenti e, quindi, con le classi di lipidi alle quali, tradizionalmente, ha avuto accesso, nel corso della propria evoluzione (Pfeuffer et al., 2006). Ciò a dire, che è stato messo in evidenza da numerosi studi epidemiologici (Craig-Schmidt, 1998) una maggiore tolleranza dell'uomo, in termini di meccanismi biochimici di autoregolazione, nei confronti di alcune classi di lipidi di origine animale, piuttosto che della stessa categoria di lipidi di origine vegetale. Ad oggi, quindi si può affermare che le evidenze scientifiche possono aiutare a ridefinire il ruolo dei prodotti di origine animale nella dieta dell'uomo, in funzione della scoperta dell'attività biofunzionale di alcuni acidi grassi veicolati all'uomo proprio a mezzo dei prodotti zootecnici ed in particolare di quelli derivati dai ruminanti. Con ciò ci si

riferisce alle numerose testimonianze scientifiche relative all'attività benefica svolta da acidi grassi quali gli isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico (CLA), dell'acido *trans*-vaccenico (VA) e, più in generale, dagli acidi grassi poli-insaturi (PUFA) a lunga catena, quali quelli delle serie n-3 e, per certi aspetti anche quelli della serie n-6 (Zyriax, et al., 2000; Steijns, 2008; Chilliard et al., 2007; Hasler, 1998; Lock, et al., 2004.). Inoltre, l'avanzamento della ricerca di settore relativamente all'attività biologica svolta da alcuni acidi grassi di origine animale, sembra poter indurre ad affermare che, soprattutto relativamente alla classe degli acidi grassi *trans* (*trans* FA), esistono sostanziali differenze, in termini di impatto sulla salute del consumatore, in funzione dell'origine degli stessi *trans* FA e della natura degli isomeri rivenibili in quantità diverse nei diversi alimenti destinati al consumo umano. In effetti, è noto che i prodotti lattiero caseari e le carni dei ruminanti contengono circa il 45-60% di VA rispetto alla quantità totale di *trans* FA, mentre le margarine, ottenute dalla parziale idrogenazione degli oli vegetali, ne contengono solo il 20 % (Craig-Schmidt, 1998). Ciò, come sarà illustrato in seguito, si traduce, nel caso dei prodotti animali, in un vantaggio netto in termini di potenziale salutistico e di attività biofunzionale, in funzione del fatto che il VA è il precursore dell'acido rumenico (RA) che, già a partire dal 1996, ad opera del National Research Council, è stato riconosciuto come l'unico acido grasso ad avere una dimostrata attività nel contrastare l'insorgenza di talune forme di cancro. Sembra evidente, quindi, che, dato il momento contingente, sia necessario fare chiarezza su quale sia lo stato dell'arte circa le reali implicazioni giocate dall'assunzione di lipidi di origine animale e le eventuali ripercussioni in termini di detrimento della salute pubblica. A questo proposito sembra importante sottolineare che nei paesi occidentali, nei quali, contrariamente a quanto avviene nel sud del mondo, si muore per eccesso di alimentazione, sia necessario che gli Stati adottino un approccio integrato in grado di promuovere la formazione del consumatore, che ha l'onere e l'onore di potersi alimentare non solo per la sussistenza, ma per implementare il proprio stato di benessere. Ciò semplicemente effettuando scelte di consumo, in termini sia qualitativi che quantitativi, maggiormente consapevoli e confacenti alle proprie



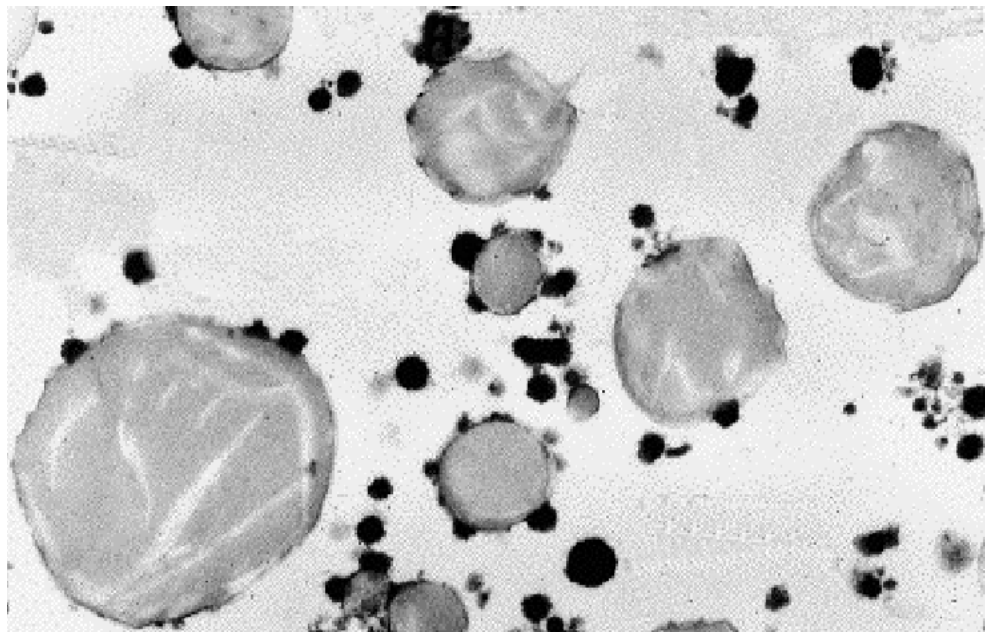
necessità fisiologiche. In occidente, vista la crescente diffusione delle patologie connesse alla scorretta alimentazione, si dovrebbe tornare a guardare al cibo come alla fonte del benessere che non può più essere declinato solo in termini di appagamento edonistico del proprio gusto personale. In effetti, in funzione dello stile di vita che inevitabilmente si riflette sulle scelte alimentari dei cittadini occidentali, sembra essersi persa la capacità di gestire la propria alimentazione avendo come scopo prevalente quello di impiegare cibi sani, ottenuti con metodi rispettosi dell'ambiente e di ingerirne quotidianamente quantità bastevoli a supportare le normali richieste energetiche. Ciò si riflette inevitabilmente sull'appiattimento della dieta che predilige per semplicità e brevità di preparazione i cibi di quarta gamma fortemente addizionati di lipidi, zuccheri semplici e conservanti e conferisce il ruolo di preparatore degli alimenti all'industria agro-alimentare. Ad oggi, in effetti, le linee guida redatte dai diversi paesi, da cui originano i vari tipi di piramide alimentare attualmente disponibili, promuovono proprio l'assunzione di quantità di alimenti strettamente necessaria alla copertura dei fabbisogni energetici, compresi quelli di origine animale, ma soprattutto raccomandano di variare la dieta e di diminuire la frequenza, non di escludere aprioristicamente, quegli alimenti che assunti in quantità eccessive possono giocare un ruolo sfavorevole sulla salute pubblica.

## **1 I LIPIDI DEL LATTE DEI RUMINANTI**

La matrice lipidica del latte è costituita prevalentemente da trigliceridi (circa 98%), mentre la rimanente quota è rappresentata da fosfolipidi di membrana (circa 1%), colesterolo (circa 0.5%) e da altre componenti come mono e digliceridi, vitamine liposolubili ed altri composti di natura lipofila (Secchiari et al., 2002). I trigliceridi del latte sono esterificati con acidi grassi che nei ruminanti hanno una doppia origine: alimentare e neo sintetica a livello della ghiandola mammaria. Ciò a dire che circa il 50% degli FA che esterificano la molecola di glicerolo, nelle 3

possibili posizioni sn, sono sintetizzati a livello della ghiandola mammaria a partire dagli acidi grassi volatili ruminali (AGV), derivanti prevalentemente dalla fermentazione dei carboidrati; mentre, la quota residua è costituita da acidi grassi preformati derivanti dalla digestione delle fonti lipidiche assunte dagli animali a mezzo della razione e/o dalla mobilizzazione del tessuto adiposo di riserva, che arrivano alla ghiandola mammaria attraverso l'azione dei carrier plasmatici (VLDL, chilomicroni, albumina). I lipidi del latte si trovano sotto forma di globuli sferici che sono secreti direttamente dalle cellule epiteliali della ghiandola mammaria. Questi globuli sono costituiti da un core di trigliceridi rivestito da una membrana chiamata membrana del globulo di grasso o Milk Fat Globule Membrane (MFGM) (figura 1).

Figura 1- Globuli del grasso dispersi nel latte



L'MFGM costituisce dal 2 al 6% dell'intera massa del globulo di grasso ed è costituita soprattutto da proteine, lipidi e carboidrati presenti in un rapporto 4:3:1. La somma di lipidi e proteine rappresenta oltre il 90% del peso secco. La composizione chimica della MFGM è influenzata da fattori legati all'animale, perciò dire, endogeni (specie, razza, stadio di lattazione, stato sanitario della

mammella) e da fattori esogeni quali l'alimentazione, il metodo di separazione del globulo di grasso, i processi che il latte subisce durante la conservazione e la lavorazione. La frazione più soggetta a variazioni è quella dei lipidi neutri, in particolare dei trigliceridi (Anderson et al., 1975; Kanno et al., 1990; Keenan et al., 1995). Le proteine presenti nella MFGM rappresentano l'1% circa di quelle totali del latte e il 25-60% del peso secco della membrana stessa.

Per quanto riguarda la frazione lipidica della MFGM relativa al latte di vacca, questa costituisce lo 0,5-1% del totale; mentre il 95-98% proviene dal core del globulo e la restante parte (1,5-4%) dal siero del latte (Kanno et al., 1982). I maggiori costituenti della frazione lipidica dell'MFGM, come accennato precedentemente, sono i lipidi neutri, i quali sono rappresentati prevalentemente da trigliceridi. Confrontando la composizione acidica dei trigliceridi della membrana e quelli del grasso del latte, emerge che i primi sono caratterizzati da una maggiore presenza di acidi grassi saturi a lunga catena (C16:0 e C18:0) e da un minor contenuto di acidi grassi a corta catena (C<12) e di acido oleico (C18:1). In effetti, numerosi studi di spettroscopia all'infrarosso hanno evidenziato che i trigliceridi associati alla membrana del globulo del grasso presentano catene aciliche più rigide rispetto a quelle presenti nel core del globulo ed è proprio da questo aspetto che sembrerebbe dipendere la stabilità dell'MFGM.

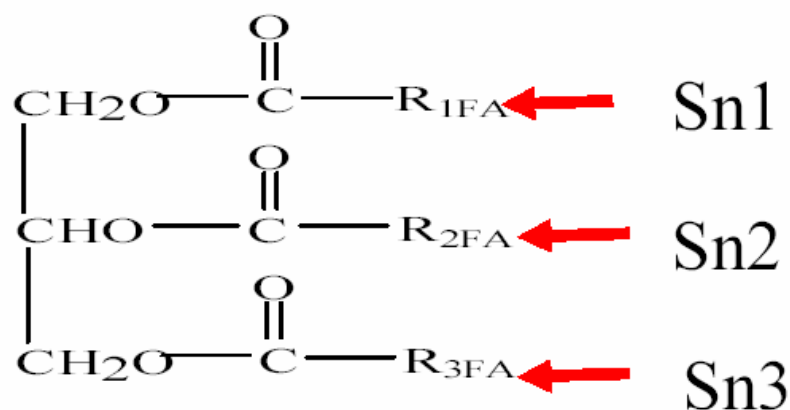
La MFGM agisce come un emulsionante naturale, permettendo a molecole idrofobe (i trigliceridi del core del globulo) di rimanere disperse in un ambiente acquoso, il plasma del latte, in quanto la frazione fosfolipidica della membrana agisce come barriera protettiva dello stesso core (Mather et al. 1998). Infine, la MFGM rappresenta una barriera fisica naturale che protegge i trigliceridi del latte dall'azione della lipasi, un enzima naturalmente presente nel latte. Detto ciò, appare evidente che quanto è maggiore il numero di globuli di grasso presenti nel latte dei ruminanti e, quindi, tanto minore è il loro diametro, tanto maggiore è la presenza relativa di steroli ed, in particolare, di colesterolo e fosfolipidi (McPherson et al., 1983).

## 1.1 I trigliceridi del latte

I trigliceridi, come esposto precedentemente, costituiscono la classe più importante dei lipidi del latte.

Il punto di partenza per la loro sintesi è la formazione del glicerolo 3-fosfato che si origina dal diidrossiacetone-fosfato e in minor misura dalla fosforilazione del glicerolo. Il glicerolo 3-fosfato viene esterificato tre volte, una per ogni gruppo alcolico, ad opera di tre enzimi diversi detti comunemente *acil-transferasi*. In breve, la fosforilazione avviene a mezzo degli steps descritti di seguito: il glicerolo 3-fosfato *aciltransferasi* (GPAT) inserisce un acile in posizione 1, successivamente interviene l'acido lisofosfatidico *aciltransferasi* (LPAAT) che esterifica la posizione 2, infine, si ha l'azione della diacilglicerofosfato *aciltransferasi* (DGAT) che aggiunge un gruppo acilico in posizione 3. Questi enzimi sono associati nel complesso della triacilglicerolo sintetasi, che è legata alla membrana del reticolo endoplasmatico. La struttura dei trigliceridi gioca un ruolo molto importante sia sulle proprietà tecnologiche del latte che sulla digeribilità del grasso. La struttura dei trigliceridi, quindi, è funzione del tipo di acidi grassi che lo compongono e del sito sn (sn1, sn2, sn3) che vanno ad esterificare (figura 2).

Figura 2 – Struttura schematica della struttura del trigliceride



Nel grasso del latte sono stati identificati 400 diversi FA. Ipotizzando che gli FA si distribuiscano casualmente sui tre siti sn della glicerina, il numero di combinazioni possibili sarebbe pari a 4003, vale a dire 64 milioni di diversi trigliceridi (Jensen et al., 1991). In realtà, è stato dimostrato da studi di settore che ogni FA ha una diversa specificità per ognuno dei 3 siti sn, tanto che di fatto il numero di trigliceridi, ad oggi, rinvenuto nel latte dei ruminanti è fatto pari a meno di cento diverse combinazioni. Ad esempio, il C4:0, come gli altri acidi grassi a corta catena, esterifica il glicerolo solo in posizione sn-3 (Christie e Clapperton, 1982).

Tuttavia, ad oggi non è ancora chiaro quale sia il meccanismo che regola questa distribuzione preferenziale. Uno degli enzimi chiave di questo processo è sicuramente l'acil *transferasi* dell'acido lisofosfatidico (LPAAT), che catalizza l'esterificazione dell'acido grasso in posizione sn-2. Questa è una posizione strategica perché le lipasi pancreatiche attaccano principalmente le altre due posizioni, generando molecole di 2-monogliceridi che vengono assorbite velocemente e in via preferenziale dalle pareti intestinali (Small, 1991).

A questo punto, sembra importante sottolineare che la qualità degli FA in posizione sn-2 può essere sicuramente modificata a mezzo della dieta e che probabilmente si potrebbe farlo anche insistendo direttamente sull'attività enzimatica, anche se a supporto di quest'ultima ipotesi non sono ancora disponibili evidenze scientifiche. Dal punto di vista operativo la selezione qualitativa degli FA che esterificano il sito sn-2 è possibile a mezzo di sistemi di razionamento in grado di fornire all'animale notevoli quantità di acidi grassi polinsaturi che, per effetto di massa, incrementano il numero di PUFA in grado di esterificare il sito sn-2 della molecola di glicerolo. Di contro, per regolare l'attività enzimatica ci si dovrebbe, verosimilmente, rivolgere al controllo degli effetti endogeni che regolano l'espressione del gene per la LPAAT.

## **1.2 I fosfolipidi del latte**

I fosfolipidi sono una classe di lipidi presente in quantità limitata nel latte, ciò nonostante, rappresentano una frazione molto importante della membrana del globulo di grasso (Secchiari et al., 2002). Tali lipidi sono sintetizzati a livello della ghiandola mammaria e rappresentano i siti preferenziali per l'esterificazione di acidi grassi essenziali. Il loro ruolo nel latte è duplice, infatti, fungono da stabilizzatori della membrana del globulo di grasso e da agenti emulsionanti.

Nel latte sono stati individuati 2 tipi di fosfolipidi: i glicerolfosfatidi e le sfingomieline. I glicerofosfatidi hanno una struttura simile a quella del grasso propriamente detto, ma una delle funzioni del glicerolo è esterificata dall'acido fosforico che a sua volta è legato ad una base organica azotata (es. lecitina e cefalina). Le sfingomieline presentano al posto del glicerolo un dialcol aminato insaturo, la sfingosina. Una sola molecola di acido grasso è legata con un legame amide, più resistente agli agenti idrolitici che il legame estere. Le principali classi di sfingomieline presenti nel latte sono la sfingomielina, la fosfatidilcolina, la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilserina e il fosfatidilinositolo, di queste le prime tre sono le più rappresentate nella membrana del globulo di grasso (Bitman e Wood, 1990). Alcuni lavori di ricerca condotti sul latte di pecora ha mostrato che la Fosfatidiletanolamina rappresenta in media il 37%, la Sfingomielina il 27% e la Fosfatidilcolina il 17.5% degli acidi grassi (Secchiari et al., 2003). La composizione di Sfingomielina e Fosfatidilcolina si mantiene praticamente costante; al contrario, le altre tre frazioni si modificano in funzione della disposizione di acidi grassi (Secchiari et al., 2003).

## **1.3 Gli acidi grassi del latte**

La composizione acidica del grasso del latte è molto ampia ed in continua evoluzione. Essa è il risultato della combinazione di fattori genetici ed ambientali.

L'alimentazione è sicuramente il fattore che concorre maggiormente a determinare il corredo di acidi grassi del latte, sia perché fornisce la materia prima per la sintesi *de novo* di quelli a corta e media catena (SCFA e MCFA), sia perché gli acidi grassi a lunga catena (LCFA) provengono dai lipidi della dieta.

Il contenuto di acidi grassi sintetizzati *de novo* diminuisce proporzionalmente (1-5%) con l'aumentare del grasso nella dieta (Palmquist et al., 1993).

I latti di pecora e di capra sono caratterizzati da un maggior contenuto di acidi

grassi a corta catena (C4-C10) e da più bassi livelli di acidi a media catena (C12-C16), rispetto al latte bovino e bufalino (Secchiari et al., 2001). La frazione degli acidi grassi monoinsaturi (MUFA), al contrario, ed il contenuto di acido oleico (OA, C18:1 *cis*-9), in particolare, risultano inferiori nel latte caprino e pecorino, rispetto a quello di vacca e di bufala. Il latte di pecora, a sua volta, presenta un maggior contenuto di isomeri *trans* del C18:1 (TFA), di isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA) e di acidi grassi polinsaturi (PUFA), rispetto a quello di vacca e di capra (Jahreis et al., 1999; Precht et al., 2001). Queste differenze tra una specie e l'altra sono legate, da un lato alla necessità dell'animale di mantenere lo stato di fluidità opportuno per la secrezione del latte, garantito dall'acido oleico (C 18:1), e dall'altro ai differenti sistemi di allevamento adottati. Un quadro completo delle differenze interspecifiche è riportato nella tabella 1.

Tabella 1- Principali classi di acidi grassi nelle diverse specie ruminanti  
(Secchiari et al., 2005)

Acido Grasso	Vacca	Bufala	Pecora	Capra
C <sub>4:0</sub>	3.29	5.10	3.73	3.34
C <sub>6:0</sub>	2.08	2.54	2.68	3.21
C <sub>8:0</sub>	1.32	1.36	2.63	3.34
C <sub>10:0</sub>	3.20	1.54	7.58	12.58
C <sub>12:0</sub>	4.05	2.08	4.88	6.45
C <sub>14:0</sub>	12.13	9.50	12.75	12.42
C <sub>14:1</sub>	1.88	0.57	0.26	0.39
C <sub>15</sub>	1.22	1.16	1.56	0.83
C <sub>16</sub>	30.74	28.17	26.37	26.02
C <sub>16:1</sub>	2.11	1.80	0.96	0.56
C <sub>17</sub>	0.57	0.50	0.85	0.76
C <sub>18</sub>	9.70	10.35	9.09	10.12
Tot C <sub>18:1 trans</sub>	1.90	2.24	3.72	2.68
Tot C <sub>18:1 cis</sub>	19.70	18.67	17.50	15.46
C <sub>18:2</sub>	3.10	1.45	1.54	2.83
Tot CLA	0.56	0.65	1.75	0.57
C <sub>18:3 n-3</sub>	0.60	0.23	1.10	0.35
C <sub>20</sub>	0.21	0.19	0.29	0.11
C <sub>20:1</sub>	0.05		0.05	0.05



## **2 ASSUNZIONE DI LIPIDI CONTENUTI NEI PRODOTTI LATTIERO-CASEARI ED IMPLICAZIONI SALUTISTICHE.**

Come accennato precedentemente, i prodotti di origine animale e, quindi, anche il latte delle diverse specie, sono stati a lungo tacciati d'essere alimenti a rischio per la salute del consumatore in funzione prevalentemente della loro componente sterolica e dell'alto contenuto in acidi grassi saturi a media catena (SFA), il cui contenuto medio è circa pari al 40% degli acidi grassi totali (Secchiari et al., 2001 a; Secchiari et al., 2002). Tali classi di lipidi, come è noto, favoriscono l'innalzamento delle lipoproteine plasmatiche ad alta densità (LDL) e l'innalzamento del rapporto LDL/HDL (Keys et al., 1965) e, quindi, sono da ritenersi fattori predisponenti le CDH. Proprio in funzione di tale evidenza scientifica, la FAO ed il WHO, da circa 20 anni, stanno promuovendo delle politiche di educazione alimentare che inducano il consumatore ad assumere fino ad un massimo del 30% dell'energia richiesta sottoforma di lipidi e che di questa, solo il 10% su base giornaliera, sia costituito da SFA.

Il contenuto di acidi grassi saturi della matrice lipidica dei prodotti di origine animale ed, in particolar modo, nei ruminanti è dovuto ai meccanismi di autoregolazione messi in atto dai micro-organismi presenti nel rumine. In effetti, il rumine può essere paragonato ad un ecosistema complesso nel quale le diverse popolazioni di microrganismi, a mezzo della propria attività metabolica, modificano la forma molecolare degli alimenti in ingresso allo scopo di garantire la propria sopravvivenza, aumentando, in questo modo, la complessità della matrice lipidica che si origina al termine di tale step digestivo. I meccanismi relativi al metabolismo lipidico strictu sensu saranno trattati di seguito, mentre nell'immediato sembra importante effettuare un breve excursus circa i meccanismi che presiedono alla formazione degli SFA per rendere più agevole la trattazione.

Come accennato precedentemente, i microorganismi ruminali entrano in contatto con gli acidi grassi insaturi (UFA) che arrivano al rumine a mezzo dell'alimentazione, dopo che le lipasi microbiche hanno agito sul trigliceride per scindere il legame tra acido grasso e glicerolo. Gli UFA sono percepiti dalle popolazioni microbiche come agenti tossici da gestire oculatamente e celermente, pena la sopravvivenza. Ciò a dire, che le reazioni di bioidrogenazione si pongono come meccanismo autoconservativo per le popolazioni ruminali, svolgendo attività detossificante. Tale fenomeno è favorito anche dalla natura fortemente riducente dell'ambiente ruminale. Dal punto di vista biochimico la totale o parziale idrogenazione degli UFA che arrivano al rumine a mezzo della dieta, si traduce nella riduzione dei doppi legami che trasformano gli acidi grassi insaturi in entrata negli omologhi a più alto e/o totale grado di saturazione. Tale meccanismo detossificante sembra essere piuttosto efficiente, tanto da ridurre circa il 70% degli UFA di origine alimentare (Mele et al., 2007). Assumere prodotti di origine animale ed, in particolar modo, ottenuti dal latte e dalla carne dei ruminanti significa, quindi, assumere SFA.

Per questo motivo, a tutt'oggi, l'attenzione di gran parte della ricerca di settore è volta ad evidenziare le effettive correlazioni esistenti tra la qualità e quantità degli SFA apportati con la dieta e le loro implicazioni in termini salutistici. In effetti, alcuni studi epidemiologici finalizzati ad evidenziare i comportamenti alimentari dei consumatori dei diversi Stati Membri hanno consentito di appurare che il tessuto adiposo dell'uomo si presenta come un finger printer delle abitudini alimentari e che, quindi, la sua analisi può essere efficace ed efficiente ad evidenziare la correlazione esistente tra alimentazione e patologie a danno dell'apparato cardio-vascolare (Mensink et al., 2005; Kromhout et al., 1995). Un altro degli scopi del presente lavoro è stato quello di evidenziare quali classi di alimenti sono maggiormente inquisite d'essere il veicolo di acidi grassi saturi e *trans* per il consumatore europeo. Tale analisi è stata condotta in funzione della quantità e della frequenza con cui i diversi alimenti a rischio sono assunti dal consumatore nell'arco della settimana.

## **2.1 Assunzione di acidi grassi saturi (SFA) ed implicazione salutistiche**

Come accennato precedentemente, circa il 40-60% degli acidi grassi che esterificano il glicerolo e che, quindi, sono trasferiti al latte sono acidi grassi saturi (SFA) a diversa lunghezza della catena. A questo proposito sembra importante sottolineare che non tutti gli SFA hanno lo stesso impatto negativo sulla salute del consumatore e che la loro percentuale relativa è da quantificarsi in funzione alla specificità per il sito sn-2 della molecola di glicerolo che esterificano. Infatti, è noto che durante il processo digestivo dei lipidi a livello dell'intestino umano le lipasi pancreatiche attaccano preferenzialmente le posizioni sn-1 ed sn-3, generando molecole di 2-monogliceridi che vengono assorbite velocemente dalle pareti intestinali ed in via preferenziale rispetto agli grassi liberi (FFA) (Small, 1991). Ciò a dire, che i FFA liberati dal glicerolo nell'intestino, in funzione del PH dell'ambiente e della presenza di ioni calcio, sono saponificati e, pertanto, non vengono assorbiti a livello intestinale. Inoltre, è stato messo in evidenza che tra gli acidi grassi maggiormente rappresentati a livello della matrice lipidica del latte quelli a maggiore specificità per il sito sn-2, sono in linea di massima gli SFA a media catena ed in particolar modo l'acido palmitico (C 16:0, circa 32.3%) (Christie, 1995; De Peters et al., 2001), ossia gli acidi grassi maggiormente implicati nell'instaurarsi e cronicizzarsi delle CHD. In effetti, numerosi studi hanno dimostrato che gli SFA direttamente correlati all'insorgenza della CHD, in funzione della loro azione sulla concentrazione plasmatica dell'LDL, sono gli acidi grassi saturi a media catena, ossia quelli costituiti da un numero di atomi di carbonio compreso tra 12 e 16. D'altronde la ricerca di settore ha potuto individuare il contributo specifico di ognuno di questi SFA a media catena relativamente all'incremento dell' LDL plasmatico e alla modificazione negativa del rapporto LDL/HDL. Ciò ha consentito di verificare che il C 12:0 ed il C 14: 0 hanno un effetto, per così dire, più marcato rispetto all'incremento della concentrazione plasmatica del colesterolo, in quanto comportano un aumento

complessivo dell'LDL (Mensink, et al., 2003). Per quel che concerne, invece, l'acido stearico (SA, C 18:0) è stato evidenziato che non ha effetto negativo sull'LDL plasmatico e che la sua azione può essere ritenuta non dissimile da quella dell'acido grasso *cis* monoinsaturo C 18:1 (OA) (Mensink, 2005), ciò in funzione del fatto che nell'uomo è attivo, a livello tissutale, l'enzima Delta 9 Desaturasi in grado di convertire circa il 40% dell'SA in OA (Chilliard Y. et al., 2001). Di contro per l'acido palmitico (PA, C 16:0), è stata individuata un'indubbia correlazione negativa, dose dipendente, sull'incremento dell'LDL plasmatico. Evidentemente, data l'alta specificità del C 16:0 per il sito sn-2 della molecola di glicerina e, quindi, la via di assorbimento preferenziale ad opera delle pareti dell'intestino umano, più che ridurre l'intera frazione satura e/o controllarne il daily intake da parte dell'uomo, risulta di primaria importanza contenerne la presenza nei prodotti di origine animale e nello specifico di quelli lattiero-caseari. Tale affermazione ha tanto più valore quanto più si pensa al fatto che per gli SFA a corta catena è stato verificato un atteggiamento neutro e/o un'azione positiva sulla salute dell'uomo. Dalle evidenze scientifiche recenti sembra, cioè, che l'assunzione di SFA a corta catena (da C4:0 a C 10:0) non implichi modificazioni significative a livello del contenuto plasmatico di LDL, né comporti alterazioni del rapporto LDL/HDL. Inoltre, è stata evidenziata un'azione spinta del C 4:0 (BA) nei confronti della prevenzione di diverse forme di tumore.

Ognuno degli SFA sopra elencati è trasferito al latte dei ruminanti a mezzo di meccanismi propri ed ha un'origine biosintetica differente, perciò al fine di contenerne o implementarne la presenza nei prodotti lattiero-caseari è necessario agire a mezzo di strategie che tengano conto del comportamento dei singoli FA e del meccanismo biochimico che presiede alla loro formazione/trasferimento. A questo proposito è stato evidenziato da numerosi lavori scientifici che la via più efficiente, efficace e reversibile di modificazione, in termini salutistici, del profilo acidico del latte dei ruminanti è la messa a punto di un corretto piano alimentare. In effetti, senza entrare nel merito dell'argomento che sarà trattato di seguito, al fine di contenere la concentrazione di C 16:0 del latte è necessario agire implementando le fonti alimentari di acidi grassi polinsaturi (PUFA) che

competono, per effetto di massa, con il PA per il sito sn-2 della glicerina. Operativamente, ciò si traduce nell'oculata scelta delle fonti lipidiche e foraggiere, sia in termini di qualità che di stato, e nella messa a punto di diete bilanciate, in grado di limitare i fenomeni di mobilitazione degli acidi grassi accumulati nelle riserve lipidiche. Ciò in funzione del fatto che circa il 50% del C 16:0 trasferito al latte deriva proprio dalla dieta o dalla mobilitazione del grasso di riserva che si verifica prevalentemente ad inizio lattazione ed ogni qualvolta il management alimentare esponga i soggetti a bilancio energetico negativo (Chilliard et al., 2001).

## **2.2 Assunzione di colesterolo ed implicazioni in termini di salute umana.**

Come messo in evidenza nel corso della trattazione, il colesterolo è lo sterolo maggiormente presente nella matrice lipidica del latte tanto da rappresentarne lo 0.5% del totale. La presenza di colesterolo nel latte è da spiegarsi in funzione dell'importante ruolo fisiologico svolto da tale lipide nel mantenimento dell'integrità delle membrane cellulari, di cui regola la fluidità e la permeabilità. Inoltre, il colesterolo è fondamentale per la produzione degli ormoni steroidei e degli acidi biliari di cui è precursore (Grundy, 1994; Yokoyama, 2000). Ciò a dire, che qualunque sia la strategia alimentare impiegata per l'alimentazione animale non è possibile indurre una riduzione nel contenuto complessivo in colesterolo del latte, in funzione del ruolo da esso giocato a livello della membrana cellulare. Infatti, è stato dimostrato che lo stesso colesterolo è lo sterolo più efficiente, dal punto di vista stereochimico, per l'interazione con i fosfolipidi di membrana (Bloch 1979; Bloch, 1983).

D'altro canto, gli studi volti a delineare le inter-relazioni esistenti tra assunzione di diete ad alto colesterolo ed insorgenza di CHD, hanno mostrato l'esistenza di una correlazione negativa dose dipendente. In effetti, è stato

dimostrato a mezzo sia di modelli animali, che di studi epidemiologici, che l'assunzione di colesterolo induce un innalzamento della concentrazione plasmatica di LDL, che come è noto è stata individuata essere uno dei fattori predisponenti le CHD. Sembra importante accennare brevemente quali sono i meccanismi metabolici umani che presiedono all'innalzamento di tale concentrazione, al fine di rendere note le vie metaboliche implicate in tale processo. In effetti, è stato evidenziato che dopo l'assunzione di colesterolo a mezzo della dieta si assiste ad un forte incremento della concentrazione plasmatica di LDL e solo ad un lieve incremento di quella in HDL, con conseguente sbilanciamento negativo del rapporto LDL/HDL. L'accresciuta disponibilità di colesterolo induce inizialmente una riduzione della sintesi di colesterolo nel sangue ed un incremento dell'escrezione fecale di steroli non assorbiti. Ciò in funzione del fatto che a livello del sistema uomo esistono dei meccanismi di autoregolazione della concentrazione sterolica, quali il maggiore trasferimento di colesterolo agli acidi biliari, l'inibizione della sintesi epatica di colesterolo, i meccanismi di down-regolazione delle apoproteine B ed E e la crescita dell'escrezione delle apoproteine B che contengono particelle lipoproteiche. Di fatto, però solo gli ultimi due meccanismi sono davvero efficienti nella regolazione della concentrazione plasmatica in colesterolo. Il fegato dell'uomo, organo d'elezione per il metabolismo diretto ed inverso del colesterolo, reagisce ad elevati livelli di assunzione di colesterolo aumentandone l'escrezione nel sangue. Ossia il fegato, al fine di detossificare il sangue, emunge in modo spinto i chilomicroni che trasportano gli steroli e risponde all'accresciuta disponibilità complessiva di colesterolo reimmettendo lipoproteine a diversa densità. Ciò a dire che il fegato, che potrebbe secernere direttamente LDL tal quale, in realtà reimmette nel plasma prevalentemente i suoi precursori in forma di VLDL e delle IDL. Tale meccanismo sembra poter spiegare l'incremento post-prandiale della concentrazione plasmatica dell'apoproteina B-IDL e sembrerebbe poter spiegare anche l'incremento della concentrazione di HDL, in funzione del fatto che i suoi precursori hanno origine dal catabolismo dell'VLDL e dell'IDL. Ossia, quando il core trigliceridico dei chilomicroni e delle VLDL si svuota, i

fosfolipidi ed il colesterolo libero che si generano sono trasferiti alle HDL. In conseguenza di ciò, si assiste, per meccanismo di down-regolazione, alla riduzione dei recettori delle LDL sulle cellule periferiche (Brown et al., 1986). Inoltre, l'aumento della concentrazione complessiva di LDL innesca un meccanismo autoregolativo recettore-indipendente, o meccanismo di scavenger, che comporta l'instaurarsi di un nuovo equilibrio tra metabolismo e catabolismo dell'LDL plasmatico. Ciò a dire, che in fase post-prandiale si assiste fisiologicamente ad un incremento complessivo della concentrazione plasmatica di lipoproteine ed in particolar modo di LDL. Dati i meccanismi di autoregolazione di cui è capace il metabolismo umano, quindi, affinché si verifichino fenomeni negativi per la salute del consumatore, è necessario assumere notevoli quantità di colesterolo a mezzo della dieta, per periodi di tempo piuttosto prolungati. Perciò, se da un lato è innegabile che l'ingestione di prodotti lattiero caseari comporta l'assunzione di significative quantità di colesterolo esogeno e che esso agisce, come accennato brevemente, sull'incremento dell'LDL plasmatico, è altrettanto vero che tale incremento non insiste più del 5-10% sul contenuto di colesterolo plasmatico. Tale aspetto, noto da circa una decina di anni, ha contribuito a ridimensionare il ruolo dell'assunzione del colesterolo esogeno in relazione ai livelli di colesterolo plasmatico (McNamara, 1997).

## **2.3 Assunzione di acidi grassi *trans* ed implicazioni salutistiche**

Gli acidi grassi *trans* (TFA) sono generalmente apportati alla dieta del consumatore moderno a mezzo dei prodotti dei ruminanti e a mezzo delle margarine e derivati ottenute tramite processi industriali di parziale idrogenazione degli acidi grassi degli oli vegetali. I TFA di origine animale si formano nel rumine a mezzo delle bioidrogenazioni ruminali, operate prevalentemente dalla popolazioni di *Butyrivibrio fibrisolvens*, per la riduzione degli acidi grassi

polinsaturi ed in particolar modo degli acidi linoleico (LA) e linolenico (ALA). Tale meccanismo metabolico, come ricordato precedentemente, è necessario alle popolazioni ruminanti stesse per preservare le condizioni ambientali necessarie alla propria sopravvivenza e, quindi, è messo in atto a scopo di detossificare l'ambiente del rumine.

La ricerca di settore ha potuto evidenziare che il contenuto medio di TFA rispetto al contenuto totale in acidi grassi del latte e della carne dei ruminanti oscilla tra l'1.8 ed il 9%, in ragione dei fattori di variazione implicati nei processi metabolici e di trasferimento di questa stessa categoria di acidi grassi (Willet et al., 1993; Lock et al., 2004) (figura 1). Gli acidi grassi *trans* maggiormente presenti nei prodotti di origine animale sono i *trans* monoeni del C18:1, ed in particolar modo il *trans* vaccenico (VA, C18:1, *trans*-11) che rappresenta dal 14 al 72% del totale dei TFA presenti nei prodotti di origine animale (Steijns, 2008).

Nel corso del tempo numerosi studi di settore hanno teso ad evidenziare una certa correlazione positiva tra l'assunzione di TFA a mezzo della dieta e l'insorgenza di CHD (Kohlmeier et al., 1997; Sanders, 1998; Williams, 2000). D'altronde data la loro configurazione geometrica *trans*, che li rende stereochimicamente simili agli SFA, non sempre è stato possibile, in seno agli studi condotti in merito, scindere il contributo specifico dei TFA da quello degli SFA relativamente alle CHD (Steijns, 2008). Tuttavia, le conoscenze più attuali tendono ad attribuire agli acidi grassi *trans* un'azione più negativa nei confronti del colesterolo plasmatico, di quella riconosciuta agli SFA. Diversi studi clinici, infatti, hanno messo in evidenza che l'azione dei TFA induce un aumento dell'LDL ed una contemporanea diminuzione delle HDL, incidendo in maniera più spinta sul rapporto LDL/HDL (Mensink et al., 2003).

Inoltre, è importante sottolineare che gli studi epidemiologici condotti nel corso del tempo, nonché l'avanzamento delle conoscenze specifiche, hanno permesso di evidenziare che il comportamento dei TFA andrebbe valutato relativamente ad ogni singolo isomero e alla natura dello stesso. Ciò a dire, che lo status quo della ricerca, ha permesso di evidenziare un comportamento ed un contributo specifico per ogni TFA relativamente alla salute umana e che, in



particolar modo, è stato reso evidente che il loro impatto negativo sull'uomo è direttamente correlato alla fonte lipidica e/o alla via sintetica che li ha originati. Con ciò ci si riferisce ai numerosi studi che hanno messo a confronto, l'impatto sulla salute del consumatore dei TFA presenti nelle margarine e/o oli parzialmente idrogenati (PHVO) con quelli derivabili naturalmente dai prodotti di origine animale. In effetti, tali tipi di approcci sperimentali hanno permesso di evidenziare il diverso comportamento dei TFA in funzione all'origine, vegetale o animale, che ne definisce la natura prevalente degli isomeri. Ciò a dire che in funzione dell'origine, ossia la bioidrogenazione ruminale degli UFA o la parziale idrogenazione ad alta pressione degli oli vegetale, il pool di TFA presente negli alimenti è costituito da acidi grassi con la medesima geometria, ma diversi tra loro per lunghezza della catena carboniosa, posizione del doppio/i legame/i, caratteristiche e comportamento chimico-fisico. In effetti, è stato dimostrato da numerosi lavori scientifici che i PHVO contengono prevalentemente acido elaidico (EA) e solo il 20% circa di acido vaccenico (VA), che è, invece, il *trans* maggiormente presente nei prodotti dei ruminanti (Steijns, 2008; Chilliard, et al., 2001). Inoltre, le margarine contengono mediamente dal 40 al 60 % di acidi grassi *trans* rispetto al totale (Lock et al., 2004) (figura 1). Tale premessa è di fondamentale importanza, dato che è stato dimostrato che la posizione del doppio legame *trans* insiste sulle proprietà fisiologiche esplicate dai TFA e sulle reazioni biochimiche da essi presiedute e/o indotte a livello di sistema uomo (Parodi, 1989).

In effetti, gli studi a cui si è accennato brevemente hanno permesso di ridimensionare l'allarmismo che si era sviluppato attorno ai TFA di origine animale, relativamente all'impatto negativo sulla salute del consumatore. In quanto è stato verificato, innanzi tutto, che l'apporto medio di acidi grassi *trans* a mezzo dei prodotti animali, a parità di quantità di alimenti considerati, è notevolmente inferiore rispetto a quello desumibile dalle margarine e derivati ed, inoltre, che è profondamente diversa la qualità e, quindi, l'impatto sulla salute del consumatore dei singoli TFA costituenti il pool. Ciò a dire, che nel corso del tempo e a mezzo dell'avanzamento delle conoscenze è stato possibile verificare

che non tutti i TFA hanno azione negativa sull'innalzamento delle LDL plasmatiche e del conseguente sbilanciamento del rapporto LDL/HDL. In particolar modo, è stata individuata una robusta correlazione positiva tra TFA e CHD solo per quel che concerne gli isomeri *trans*-10 e *trans*-9 del C 18:1, mentre per il *trans* vaccenico (C18:1 *trans*-11), preponderante nel latte dei ruminanti, questa correlazione non è stata dimostrata (Hodgson et al., 1996). Inoltre, l'analisi della composizione delle placche ateromatose di individui deceduti a seguito di patologie CHD ha consentito di mettere in evidenza la presenza di *trans*-9 e *trans*-10 C18:1, ossia i due TFA maggiormente rappresentati nelle margarine. Questo è il motivo per cui numerosi Paesi Europei, tra cui la Danimarca, si sono dotati di linee guida e regolamentazioni specifiche per limitare l'assunzione giornaliera di TFA al di sotto del 2% del totale dei FA ingeriti. Tali documenti d'indirizzo, però, non hanno preso in considerazione i prodotti di origine animale, ma piuttosto hanno concentrato la propria attenzione sulle PHVO (Danish Ministry of Food Agriculture and Fisheries, 2004).

## **2.4 Assunzione di CLA e loro ruolo biologico.**

La presenza dei CLA nel grasso dei ruminanti è nota fin dall'inizio del XX° secolo, per molti anni è stata messa in esclusiva relazione con i processi di bioidrogenazione ruminale e, in particolare, con il processo biochimico di riduzione dell'acido linoleico ad acido stearico, operato da microrganismi cellulosolitici quali il *Butyrivibrio fibrisolvens*. I primi due step del processo di bioidrogenazione dell'acido linoleico, infatti, portano alla formazione di isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico coniugato e dell'acido octadecenoico (Kepler et al., 1966) e, per questo motivo, le prime ipotesi sulla presenza di CLA nel latte e nella carne dei ruminanti si basavano sul presupposto che questi gruppi di acidi fossero di esclusiva origine ruminale (Parodi, 1977). Anche la stretta relazione lineare esistente tra il contenuto di acido vaccenico (VA; *trans*11 C18:1) e quello di *cis* 9, *trans*11 CLA (RA, Kramer et al., 1998) nel latte, evidenziata da

molti autori, inizialmente venne interpretata come conseguenza del fatto che entrambi gli acidi originavano dalla bioidrogenazione dell'acido linoleico (Jiang et al., 1999; Lawless et al., 1998).

In realtà, come è stato chiarito successivamente, si trattava di una relazione substrato/prodotto legata al processo che, a livello tissutale, conduce da acido vaccenico ad acido rumenico. Ciò che indusse a riconsiderare l'ipotesi sull'origine esclusivamente ruminale dei CLA furono i risultati di alcune sperimentazioni basate sulla somministrazione a bovine da latte di diete povere in acido linoleico, ma ricche di acido  $\alpha$ -linolenico (C18:3 n-3) o di olio di pesce (Dhiman et al., 1999; Chouinard et al., 1999). In questi casi, infatti, è stato evidenziato un aumento di CLA nel grasso del latte (figura 3), sebbene il processo di bioidrogenazione ruminale dell'acido  $\alpha$ -linolenico non preveda la formazione di CLA come prodotti intermedi. A questo si deve aggiungere che, secondo alcuni autori, durante i processi di bioidrogenazione ruminale l'acido rumenico avrebbe un'emivita molto breve e solo l'acido vaccenico sarebbe in grado di accumularsi nel liquido ruminale (Harfoot et al., 1988).

Tutto ciò, in definitiva, rendeva difficilmente spiegabili gli alti livelli di CLA osservati nel latte e nella carne dei ruminanti, senza prevedere un apporto biosintetico alternativo a quello ruminale.

Il fatto che l'acido rumenico potesse derivare anche dall'attività di sintesi dei tessuti animali fu ipotizzato da Parodi (1994) basandosi sui risultati di ricerche precedenti che descrivevano i substrati dell'enzima  $\Delta 9$  desaturasi, anche denominato Stearoyl-CoA-Desaturasi (SCD), nei microsomi del fegato di ratto (Pollard et al., 1980; Holman e Mahfouz, 1981). In questi studi veniva chiaramente evidenziata la possibilità da parte dell'SCD di desaturare la maggior parte degli isomeri *trans* C18:1 ad eccezione di quelli che contengono il doppio legame in posizione  $\Delta 8$ ,  $\Delta 9$  e  $\Delta 10$ , per i quali l'efficienza di conversione non risultava misurabile. In particolare, il tasso medio di desaturazione degli isomeri *trans*-11, *trans*-7, *trans*-12 e *trans*-14 C18:1, ad opera dell'SCD, era pari a 0.088 nmoli/mg/min. (Holman et al., 1981).

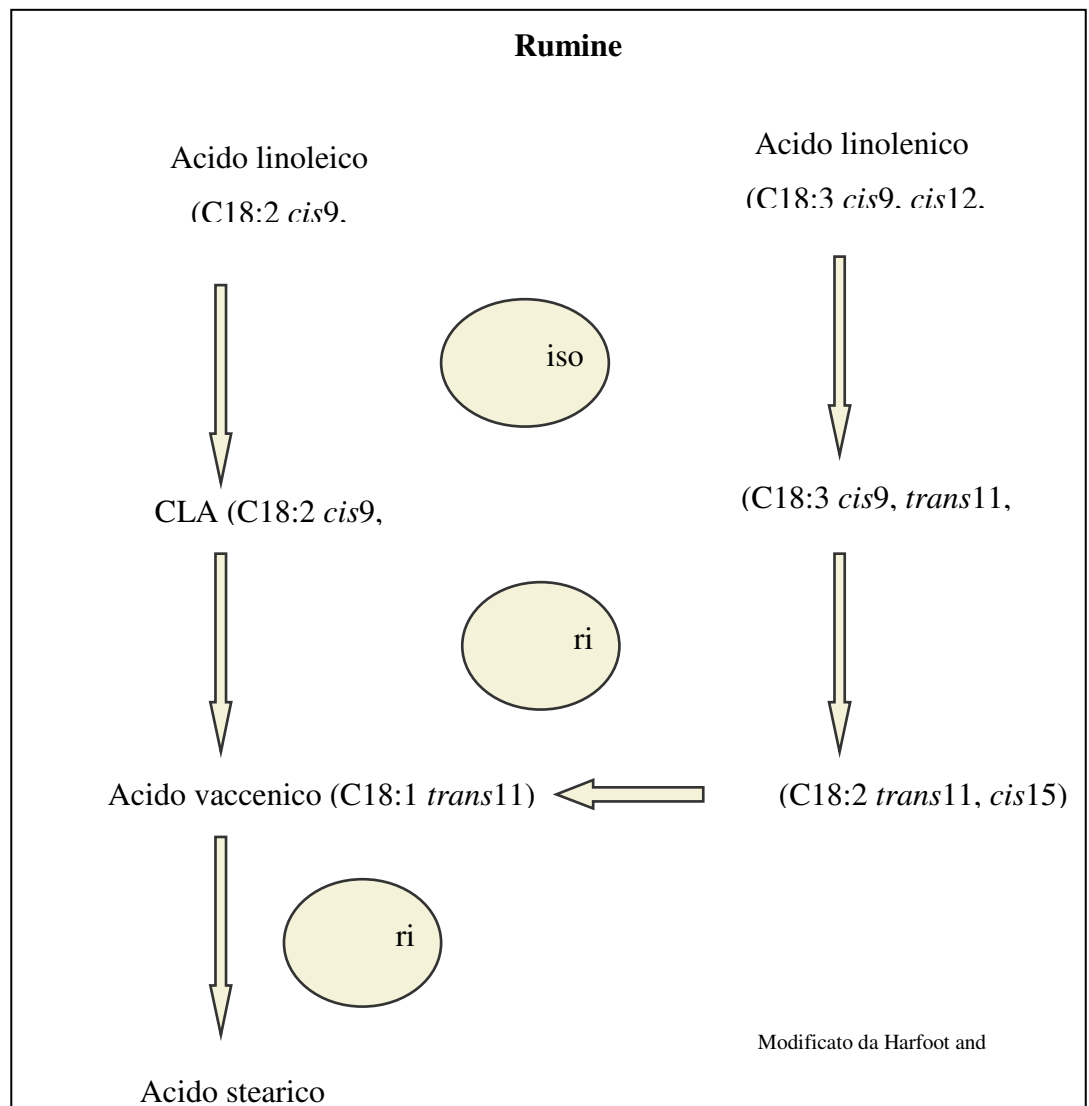
In precedenza, studi su cellule microsomiali di fegato di ratto avevano consentito di definire gli acidi grassi saturi a 16, 17 e 18 atomi di carbonio come i substrati preferenziali per l'enzima SCD (Pollard et al., 1980). Tutti gli isomeri *trans* del C18:1, inoltre, tranne quelli insaturi in posizione  $\Delta 8$ ,  $\Delta 9$  e  $\Delta 10$ , sembravano poter essere desaturati in maniera estesa. Gli isomeri *cis* del C18:1 con doppio legame prima della posizione  $\Delta 13$ , invece, non costituivano substrato utile per l'attività di questo enzima.

Sulla base di questi risultati è stata ipotizzata anche la biosintesi tessutale dell'isomero *trans*-7, *cis*-9 CLA (Salminen et al., 2001), che in effetti è stato identificato in diversi prodotti dei ruminanti quali il latte e il formaggio vaccino, il grasso della carne, nonché nel latte e nel tessuto adiposo umano (Yurawecz et al., 1998); dal punto di vista quantitativo, tuttavia, l'isomero più importante rimane sicuramente l'acido rumenico.

Per quanto riguarda i ruminanti, è noto da tempo il fatto che durante la lattazione, nel tessuto mammario è attivo l'enzima SCD (Kinsella, 1972). La ghiandola mammaria, infatti, è in grado di controllare la fluidità del grasso del latte proprio mediante la conversione dell'acido stearico in acido oleico, che compete con gli acidi grassi a corta catena per la posizione sn-3 sul trigliceride (Palmquist et al., 1993).

Gli isomeri coniugati dell'acido linoleico (CLA), quindi, rappresentano un gruppo di acidi grassi caratterizzati dall'avere due doppi legami adiacenti ( $R-CH=CH-CH=CH-R$ ) con isomeria geometrica e posizionale variabile.

Figura 3 – Vie biosintetiche che presiedono alla formazione dei CLA



Teoricamente è possibile ipotizzare l'esistenza di un numero rilevante di isomeri CLA; il diene coniugato può presentarsi, infatti, in diverse posizioni della catena carboniosa (composta, nel caso dei CLA, da 18 atomi di carbonio). I doppi legami si possono trovare in corrispondenza della coppia di carboni 7-9, come pure di quelle 8-10, 9-11, 10-12 e così via. Inoltre, ognuno di questi isomeri di posizione, si può differenziare in ulteriori quattro isomeri geometrici, in funzione della posizione reciproca assunta nello spazio dagli idrogeni posti in corrispondenza dei carboni interessati dai doppi legami. Si possono presentare, pertanto, le seguenti combinazioni: *cis-trans*, *trans-cis*, *cis-cis*, *trans-trans*.

La presenza di questi acidi grassi negli alimenti ottenuti dai ruminanti, come accennato precedentemente, è nota da molto tempo. Già nel 1935, infatti, Booth et al. hanno pubblicato sul *Journal of Biochemistry* un lavoro relativo alle variazioni stagionali della composizione del burro in cui era stato messo in evidenza un notevole assorbimento a 230 nm nell'ultravioletto, lunghezza d'onda alla quale si massimizza l'assorbimento del diene coniugato. Tale tipo di assorbimento e, quindi, tale peculiarità dello spettro, è stato verificato essere direttamente proporzionale alla quantità e qualità delle risorse foraggere, ed in particolar modo, di pascolo assunto dagli animali.

La grande attenzione riservata dalla ricerca di settore ai CLA, tuttavia, ha origine da una scoperta occasionale di Michael Pariza, un ricercatore americano, che nel 1979 ha rilevato la presenza nella carne di hamburger di una sostanza con attività anti-mutagenica, che, testata sui ratti, si è dimostrata in grado di inibire alcune forme di tumore indotte chimicamente. Poco tempo dopo, lo stesso Pariza ha messo in evidenza che la sostanza dalle sopra citate proprietà non era una singola molecola, ma piuttosto un pool di molecole meglio identificato, per l'appunto, come l'insieme degli isomeri geometrici e posizionali dell'acido linoleico coniugato (CLA). A partire da questo impulso, un numero sempre crescente di gruppi di ricerca si è cimentato nello studio degli effetti biologici dei CLA sulla salute umana e dei meccanismi biochimici e fisiologici che presiedono alla maggiore/minore presenza di questa classe di FA nel latte e nei tessuti dei ruminanti.

Come evidenziato dal breve excursus sopra esposto, l'interesse della comunità scientifica relativamente ai CLA è da ricercarsi proprio nella loro stessa attività biofunzionale. In effetti, secondo la National Academy of Science (NCR, 1996) i CLA sono gli unici FA per i quali è stato possibile evidenziare, a mezzo di modelli animali, la loro inequivocabile attività anticarcinogena.

E' stato dimostrato, inoltre, che questa molecola può evidenziare attività immunomodulante, oltre che essere attiva anche in altre patologie come l'aterosclerosi, il diabete e l'obesità. Tali proprietà biofunzionali sono state inizialmente evidenziate e sperimentate a mezzo di modelli animali, ma

l'avanzamento della ricerca di settore ha permesso di passare al modello uomo. È bene sottolineare che le proprietà biofunzionali a cui si è fatto riferimento non sono proprie dell'intero pool di CLA rinvenibili nei prodotti dei ruminanti, ma da attribuirsi specificatamente ai singoli isomeri. Ciò a dire, che per quel che concerne l'attività anticarcinogena si sono rivelati attivi solo gli isomeri *cis*-9, *trans*-11 e *trans*-10, *cis*-12 e non è da escludere un'azione sinergica dei due. Alcuni studi condotti sui ratti hanno evidenziato che, nel caso del carcinoma della mammella, l'azione del CLA è dose dipendente e i migliori risultati si ottengono se l'assunzione avviene durante il periodo dello sviluppo di questo tessuto. Gli stessi risultati sono stati ottenuti nel caso del tumore all'intestino e alla prostata. Il meccanismo d'azione non è ben noto, soprattutto perché si esplica durante stadi diversi dello sviluppo del cancro. Tuttavia, i risultati di numerosi studi in vitro suggeriscono che il CLA modula i segnali molecolari che influiscono sul ciclo cellulare, regolando così la proliferazione cellulare. Inoltre, è noto con assoluta certezza che il CLA compete con l'acido linoleico (LA) riducendo la formazione dell'acido arachidonico (AA), precursore degli eicosanoidi che svolgono un ruolo importante nella carcinogenesi. Il CLA, infatti, può essere metabolizzato come il LA originando altri acidi a lunga catena che mantengono la coniugazione ed interferiscono con la sintesi degli eicosanoidi e della prostaglandina E. Esperimenti condotti su cavie da laboratorio hanno permesso di osservare la distribuzione del CLA all'interno dei lipidi, evidenziando un'esterificazione preferenziale nei trigliceridi, in posizione sn-2, piuttosto che nei fosfolipidi. Analogo comportamento è tenuto dai suoi metaboliti, fatta eccezione per il C20:4 coniugato che si dispone nei fosfolipidi, per la precisione nella fosfatidilserina, a differenza dell'acido arachidonico, suo isomero posizionale, che si trova nella fosfatidilcolina. I risultati ottenuti utilizzando sia il *cis*-9, *trans*-11 sia il *trans*-10, *cis*-12 non differiscono in maniera significativa, ma è comunque da notare il loro diverso comportamento nella cascata dei metaboliti. Il *cis*-9, *trans*-11, infatti, arriva fino alla sintesi del C20:4, mentre l'isomero *trans* 10, *cis* 12 determina un accumulo dell'acido linolenico coniugato, dovuto ad un blocco dell'enzima

elongasi. Anche quando il CLA è ossidato, sembrerebbe avere un'attività anticarcinogena a causa della sua citotossicità.

Il *cis-9 trans-11*, oltre a modulare l'incorporazione dell'acido arachidonico, induce anche l'aumento di retinolo (Vitamina A). L'attività di questo isomero CLA sulla sintesi degli eicosanoidi e sull'aumento di retinolo tissutale potrebbero rappresentare i fattori chiave per spiegare i suoi effetti pleiotropici.

Alcune prove sperimentali effettuate su ratti, dimostrerebbero che l'isomero *cis-9 trans-11* si comporta come promotore della crescita, agendo positivamente sull'efficienza di utilizzo dei nutrienti, senza modificare la composizione corporea. Al contrario, l'isomero *trans-10, cis-12* modifica la composizione corporea facendo aumentare la massa magra e riducendo quella grassa. Esso, infatti, impedirebbe l'introduzione dei lipidi nelle cellule degli adipociti interferendo con l'attività degli enzimi lipoproteinlipasi e stearoyl-CoA desaturasi.

In quest'ultimo caso, oltre ad agire direttamente sull'enzima inibendolo, impedirebbe anche la trascrizione del gene con un meccanismo al momento sconosciuto. L'attività esercitata da questi isomeri non sembrerebbe essere collegata ai loro metaboliti, ma esplicata direttamente nei confronti dei rispettivi target.

Fra le proprietà svolte dai CLA nell'interazione col sistema uomo sono state evidenziate anche quella antiaterogena ed ipocolesterolemica. In effetti, è stata osservata una diminuzione del tasso di colesterolo LDL nel plasma, con conseguente decremento della formazione di placche aterosclerotiche, in ratti alimentati con diete arricchite con questi i suddetti CLA. Anche in questo caso il meccanismo non è del tutto chiaro, ma sembra che il CLA, in competizione con l'arachidonico, che è responsabile della sintesi di fattori promotori dell'aggregazione delle placche aterosclerotiche (TXA<sub>2</sub>), inibisca la ciclossigenasi che è un enzima attivo nella cascata dell'arachidonico.

Gli effetti positivi sul diabete, invece, sembrano essere correlati al miglior utilizzo del glucosio presente nel plasma ed ad una maggiore efficienza dell'insulina, tuttavia i meccanismi biosintetici alla base di questa risposta fisiologica non sono, ad oggi, ancora noti. Alcuni studi effettuati su di un gruppo



di 127 volontari umani, hanno evidenziato una correlazione positiva fra la quantità di *cis*-9, *trans*-11 presente nel sangue e nel tessuto adiposo ed il consumo di latte.

Nei ratti un elevato consumo di CLA a mezzo della dieta, fornito sotto forma di burro arricchito, ha comportato una maggiore incorporazione di questi FA nei tessuti; probabilmente tale effetto è stato amplificato anche dalla parziale desaturazione dell'acido vaccenico (VA, *trans*-11 C18:1) operata dalla  $\Delta^9$ desaturasi a livello tissutale. Questo stesso meccanismo biosintetico è stato osservato anche a livello dell'uomo, nel quale sembra che l'enzima SCD sia in grado di desaturare, a livello tissutale, circa il 20% del VA assunto con la dieta e, quindi, accrescere la percentuale relativa di *cis*-9, *trans*-11 C 18:1 apportato dagli alimenti all'uomo (Banni, comunicazione personale).

## **2.5 Assunzione di acidi grassi monoinsaturi (MUFA) e ripercussioni sulla salute umana**

E' noto che nei prodotti di origine animale i MUFA sono costituiti prevalentemente da OA (*cis*-9 C18:1), ma negli alimenti derivati dai ruminanti sono presenti anche buone quantità isomeri *trans* del C18:1 e quantità apprezzabili di isomeri *cis* di acidi diversi dall'oleico. L'intero pattern di MUFA presenti nei prodotti dei ruminanti si origina prevalentemente ad opera delle bioidrogenazioni ruminali a carico degli alimenti apportati al rumine a mezzo della dieta.

L'importanza dei MUFA, in termini di implicazioni salutistiche, è dovuta all'azione dell'OA nel calmierare la concentrazione dell'LDL plasmatico senza, però, agire su quella dell'HDL, modificando positivamente il rapporto LDL/HDL (Ulbricht et al., 1991 ). In funzione di questa evidenza scientifica, molti autori hanno individuato proprio nell'OA il candidato perfetto per sostituire i SFA dei prodotti di origine animale, andando ad incrementarne gli apporti a mezzo dell'alimentazione e ottenendo, quindi, una competizione per il sito sn-2 della glicerina per effetto di massa. Inoltre, questo approccio alla modificazione quali-

quantitativa del grasso dei ruminanti sembrerebbe poter ovviare agli effetti negativi dell'ossidazione dei PUFA, che per loro stessa natura stereochimica sono facilmente soggetti ad essere ossidati, dando luogo a metaboliti con effetti non positivi sulla salute del consumatore anche relativamente alle CHD (Nielsen et al., 1995; Williams, 2000).

Il latte e la carne dei ruminanti contengono importanti quantità di acido oleico, in conseguenza dell'attività enzimatica dell'SCD che converte circa il 50% di PA in OA (tabelle 1, 2). Ciò a dire che per incrementare il contenuto medio di OA nei prodotti ruminanti si può agire sia impiegando specifici programmi di razionamento opportunamente arricchiti con fonti lipidiche ad alto contenuto in OA, sia rendendo maggiormente efficiente l'attività dell'SCD.

Tabella 2- Composizione acidica (%) del *Longissimus dorsi* relativamente alle classi dei trigliceridi e dei fosfolipidi delle specie suina, ovina, bovina (Wood et al., 2008)

	Trigliceridi			Fosfolipidi		
	Suini	Ovini	Bovini	Suini	Ovini	Bovini
14:0	1.6	3.0	2.7	0.3	0.4	0.2
16:0	23.8	25.6	27.4	16.6	15.0	14.6
16:1 <sub>cis</sub>	2.6	2.2	3.5	0.8	1.5	0.8
18:0	15.6	13.6	15.5	12.1	10.4	11.0
18:1 <sub>cis</sub> -9	36.2	43.8	35.2	9.4	22.1	15.8
18:2 n-6	12.0	1.5	2.3	31.4	12.4	22.0
18:3 n-3	1.0	1.2	0.3	0.6	4.6	0.7
20:4 n-6	0.2	ND	ND	10.5	5.9	10.0
20:5 n-3	ND	ND	ND	1.0	4.1	0.8

Proprio in questo senso dev'essere letto l'interesse di alcuni gruppi di ricerca che di recente, hanno valutato le differenze genetiche nell'attività dell'SCD delle bovine da latte (Tanigouchi et al., 2003; Mele et al., 2007).

Gli alimenti derivati dai ruminanti contengono anche MUFA con doppi legami in posizione *trans*. Come è noto, nei ruminanti i TFA si originano come intermediari delle bioidrogenazioni ruminali a carico dei PUFA di origine alimentare (figura 2). Il contenuto totale di *trans* MUFA nei prodotti lattiero-

caseari varia dall'1 al 6% del totale dei FA, in funzione del management alimentare degli animali, e l'isomero maggiormente rappresentato è il VA. Attualmente, la ricerca non è ancora in grado di dare risposte precise circa il ruolo giocato dai singoli *trans* MUFA, fatta eccezione per l'acido elaidico (EA) particolarmente rappresentato nel PHVO. In effetti, non è ancora noto l'effettivo ruolo dallo stesso VA nel favorire o prevenire le CHD; d'altronde, come evidenziato in precedenza, è stato verificato che almeno il 20% del VA di origine alimentare è desaturato a livello tissutale dell'enzima SCD che lo converte in RA, con indubbio effetto benefico sulla salute del consumatore.

Ciò a dire, che secondo il principio di precauzione, il mondo scientifico non si è ancora pronunciato sull'effetto biologico svolto dai singoli *trans* MUFA dei prodotti lattiero caseari, però, ha espresso un parere ragionevolmente positivo nei confronti del VA, proprio in funzione del suo ruolo di precursore del RA.

## **2.6 Ruolo biologico degli grassi polinsaturi (PUFA)**

E' noto da tempo il ruolo biologico giocato dagli acidi grassi polinsaturi (PUFA) che sono veicolati all'uomo prevalentemente a mezzo dei prodotti di origine animale ed, in particolare, dei ruminanti e dal pesce. Per quel che concerne i ruminanti è ormai risaputo che l'acido  $\alpha$ -linolenico (ALA) è il precursore dei PUFA bioattivi della serie n-3 (EPA e DHA), a mezzo di una serie di step successivi che prevedono elongazioni e desaturazioni comunemente promosse dagli enzimi coinvolti nel metabolismo dei PUFA n-6 (figura 4). D'altronde, i PUFA della serie n-3 hanno suscitato notevole interesse in funzione delle evidenze scientifiche che hanno permesso di evidenziare la correlazione positiva esistente tra la loro assunzione e la prevenzione delle CHD. Inoltre, la ricerca di settore ha dimostrato l'azione biofunzionale degli n-3 EPA e DHA relativamente ad altre importanti patologie dell'uomo moderno quali l'ipertensione, i disordini a carico del sistema immunitario, la depressione ed alcune disfunzioni di tipo neurologico. Ciò nonostante, diversi studi epidemiologici hanno reso evidente che

tali acidi grassi sono assunti dal consumatore occidentale in quantità ridotte, in funzione della ridotta assunzione di pesce e derivati che ne sono le fonti d'elezione.

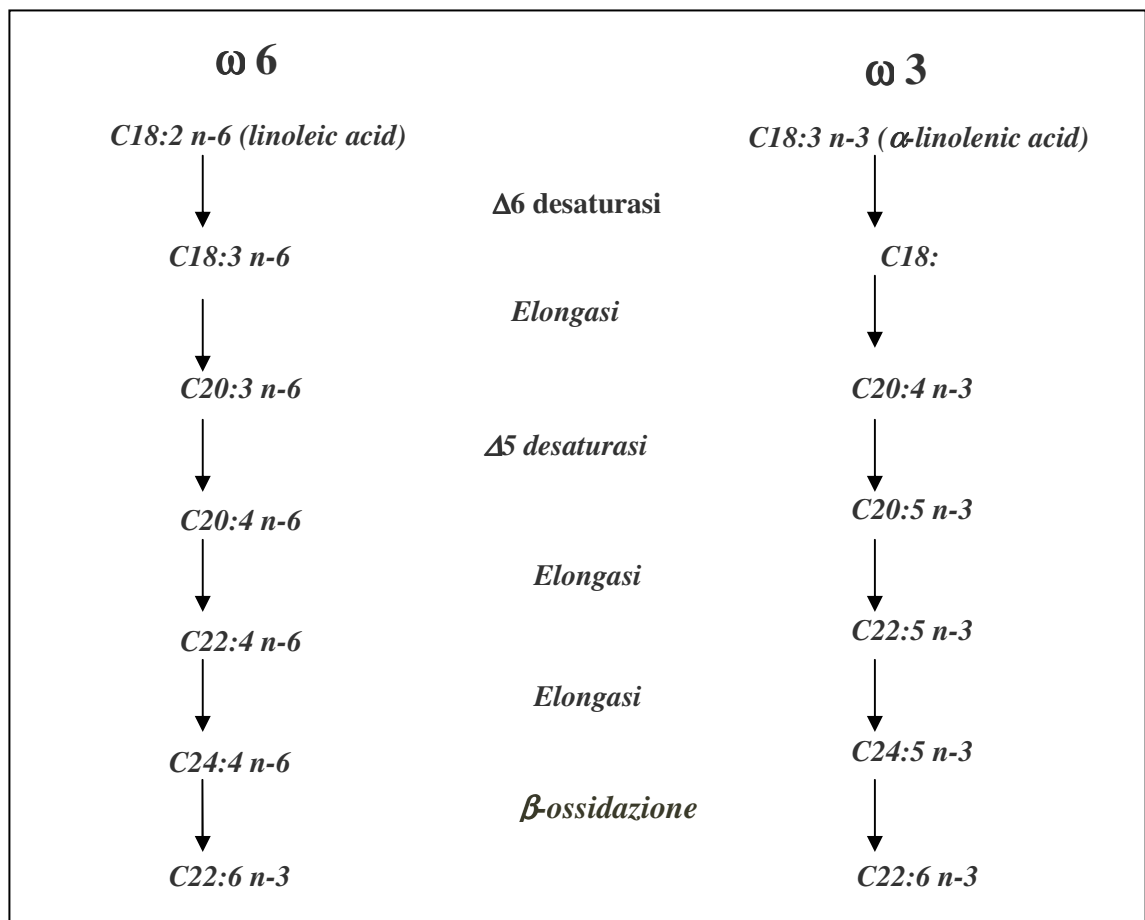
D'altronde, è noto che i prodotti lattiero-caseari apportano naturalmente ridotte quantità di EPA e DHA, in relazione al fatto che questi PUFA partecipano preferenzialmente alla costituzione dei fosfolipidi che rappresentano solo circa l'1% della matrice lipidica. Per questo motivo molta parte della ricerca applicata ha concentrato la propria attività sulle possibili strategie per implementare il contenuto medio di PUFA n-3 nei prodotti dei ruminanti.

In questo senso sono da spiegare le prove di alimentazione condotte impiegando oli di pesce rumino protetti, che però non hanno comportato un incremento importante del contenuto medio di PUFA n-3 negli alimenti ottenuti per questa via. D'altronde, è noto che la carne dei ruminanti, essendo più ricca in fosfolipidi, è una fonte maggiore di PUFA rispetto al latte e derivati.

Relativamente a quest'aspetto è, però, importante precisare che data la diffusione di sistemi semi-intensivi d'allevamento che comportano il ricorso ad elevate quote di concentrati per l'alimentazione animale, è stato dimostrato che la maggior quota dei PUFA della carne dei ruminanti sono della serie n-6.

Ciò, in termini salutistici non si presenta come una caratteristica positiva, in funzione dello sbilanciamento del rapporto n-6/n-3 e della confermata azione pro-infiammatoria e pro-trombotica svolta dagli n-6 ed, in particolar modo, dall'acido arachidonico (AA).

Figura 4 – Schema delle vie biosintetiche che presiedono alla formazione ruminale dei PUFA delle serie n-6 ed n-3



Ciò a dire che anche nel caso dei PUFA, è bene operare dei distinguo circa il ruolo biologico svolto ed è comunque di fondamentale importanza, non tanto e non solo, valutare l'apporto medio degli alimenti di origine animale delle due diverse serie di PUFA, quanto valutare il rapporto tra esistente tra n-6/n-3, in funzione del fatto che è proprio questo valore ad insistere realmente sul detrimento/implemento della salute pubblica.

La necessità di ottenere prodotti di origine animale con caratteristiche nutrizionali ad alto valore salutistico, quindi, ha indotto certa parte della ricerca di settore a concentrare la propria attività sull'individuazione delle strategie alimentari più efficienti e persistenti da impiegare per l'arricchimento naturale di questi stessi alimenti. In questo senso, sono state vagliate sia strategie alimentari finalizzate alla somministrazione di diete che comportassero l'arricchimento in ALA, sia sistemi in grado di incrementare il contenuto medio in EPA e DHA. Ciò

ha consentito di evidenziare che a livello biosintetico si ha un discreto grado di inefficienza nella conversione dell'ALA nei PUFA della serie n-3, fatto salvo l'incremento a cui fa assistere la concentrazione media di EPA.

Appare, quindi, evidente che l'arricchimento naturale dei prodotti lattiero caseari in EPA e DHA è possibile entro certi limiti e che, quindi, data l'importanza, in termini salutistici, dell'assunzione di n-3 il consumatore occidentale dovrebbe prevedere di inserire nella propria dieta pesce e derivati al fine di riequilibrare il rapporto n-6/n-3 e contrastare a mezzo della propria dieta le CHD ed i disturbi connessi.

## **2.7 Ruolo biologico degli acidi grassi a catena ramificata (BCFA)**

Gli acidi grassi a catena ramificata (BCFA) sono tipici dei prodotti della carne e del latte dei ruminanti ed, in particolar modo, dei piccoli ruminanti quali le specie ovina e caprina. Biologicamente la presenza dei BCFA nei prodotti dei ruminanti è da spiegarsi in relazione alla presenza nel rumine delle diverse popolazioni batteriche che contengono nella propria membrana importanti quantità di acidi grassi a catena dispari e ramificata quali, in particolar modo, le forme iso ed anteiso del C 15:0, del C 17:0 e l'acido eptadecenoico (C 17:1) (Vlaemink et al., 2005).

Per quanto riguarda il ruolo biologico dei BCFA, è stata osservata una relazione positiva per la salute umana tra gli acidi grassi a catena ramificata e attività anti-tumorale (Wongtangtharn et al., 2004). La più alta attività in questo senso è esplicata dal iso-16:0, mentre i BCFA a catena più lunga sembrano avere effetti meno importanti. Sia le forme anteiso che le forme iso dei BCFA hanno effetti citotossici sulle cellule tumorali. In effetti, la capacità citotossica dei BCFA è tale da sembrare comparabile con quella dei CLA che, come accennato nel corso della trattazione, sono gli unici acidi grassi a cui attualmente è riconosciuto un

indubbio ruolo biofunzionale. In particolare modo ai BCFA è attribuita la capacità di sopprimere la proliferazione e lo sviluppo delle cellule tumorali (Wongtangtintharn et al., 2004). Precedenti studi hanno riportato che la forma iso C15, purificata da prodotti di fermentazione della soia, inibiva la proliferazione cellulare e l'induzione dell'apoptosi in molte cellule tumorali come quelle del cancro alla prostata, le cellule leucemiche e quelle del carcinoma mammario (Yang et al., 2000). Il meccanismo che si ipotizza essere alla base dell'attività antitumorale è la riduzione della biosintesi tissutale degli acidi grassi sia diminuendone la disponibilità di precursori, sia a mezzo di un effetto inibitorio diretto sull'enzima sintasi degli acidi grassi stessi (Wongtangtintharn et al., 2004). In effetti, le cellule di molte forme di cancro che interessano l'uomo esprimono più alti livelli dell'enzima sintasi degli acidi grassi. Pertanto, questa espressione differenziale dell'enzima tra tessuto non malato e tessuto malato ha indotto a pensare che l'enzima stesso sia un target per lo sviluppo di farmaci antitumorali (Kuhajda, 2000).

### **3 I LIPIDI DEL LATTE: ORIGINE E METABOLISMO**

Come accennato precedentemente, i ruminanti sintetizzano i lipidi a partire da precursori che giungono alla ghiandola mammaria attraverso due vie: la via delle fermentazioni ruminali e quella delle attività digestive post-ruminali, a partire dai lipidi della dieta.

#### **3.1 Metabolismo lipidico nel rumine**

Gli esteri della glicerina che compongono i lipidi della dieta, quando vengono a contatto con le popolazioni microbiche ruminali, sono sottoposti a

lipolisi e a bioidrogenazione (Harfoot, 1978; Jenkins, 1993, Palmquist et al., 1980). La prima comporta il rilascio di acidi grassi dagli esteri consentendo così la successiva bioidrogenazione, cioè la riduzione del numero di doppi legami eventualmente presenti lungo la catena carboniosa dell'acido grasso. Durante la permanenza dell'alimento nel rumine, la quantità di acidi grassi assorbita dall'epitelio ruminale o catabolizzata ad acidi grassi volatili (VFA) ed anidride carbonica è minima, mentre i microrganismi sono in grado di sintetizzare ex novo quantità apprezzabili di acidi grassi dai carboidrati precursori. Pertanto, gli acidi grassi che raggiungono il duodeno sono in parte di origine alimentare ed in parte derivanti dall'attività microbica.

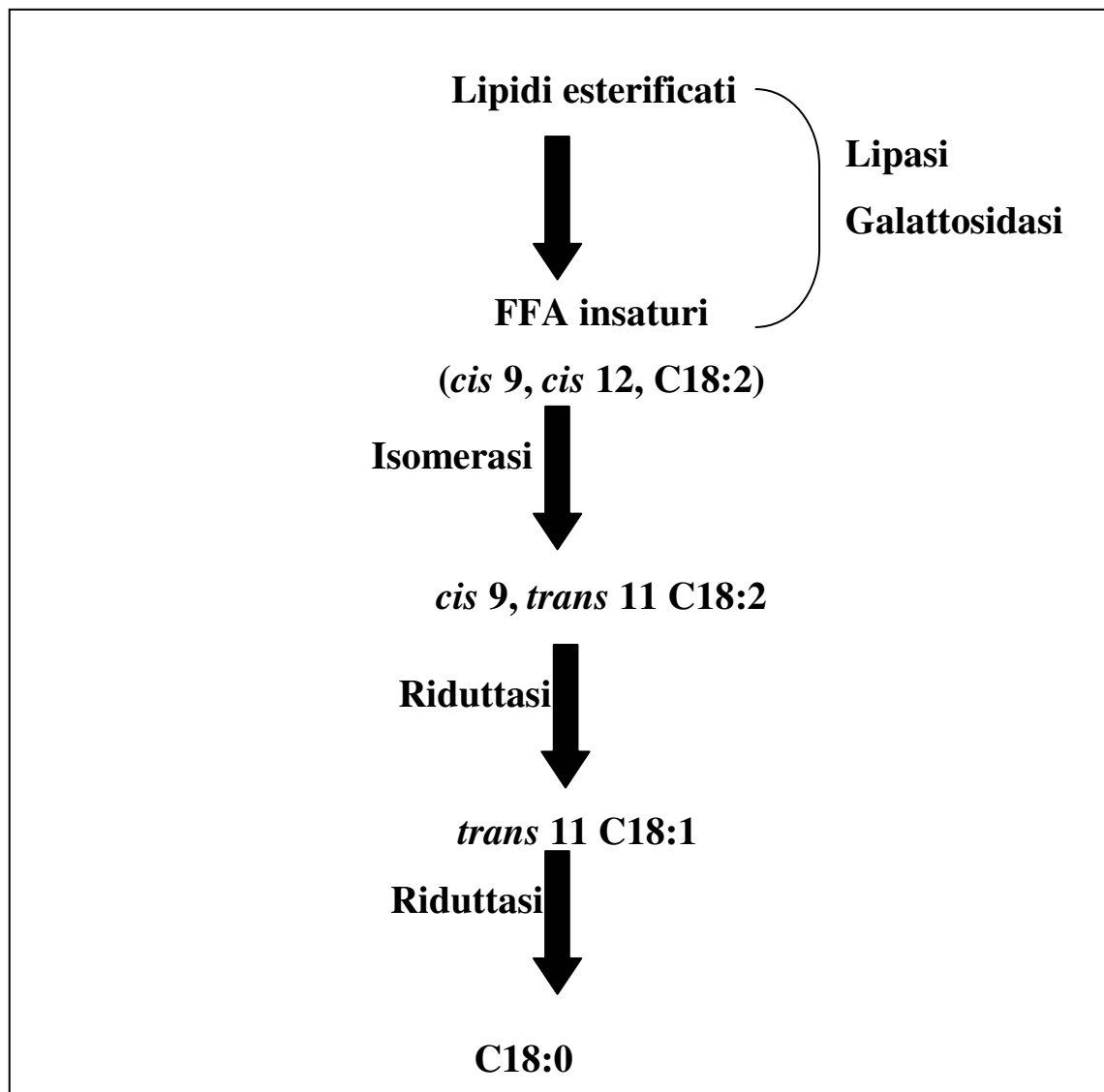
### *3.1.1 La lipolisi*

Poco tempo dopo essere stati ingeriti, gli esteri della glicerina contenuti nell'alimento vengono idrolizzati dalle lipasi microbiche che causano il rilascio degli acidi grassi costitutivi (Figura 5). La lipasi è un enzima extra cellulare assemblato in particelle dotate di una membrana composta da proteine, lipidi ed acidi nucleici (Jenkins, 1993). La lipasi idrolizza completamente i trigliceridi ad acidi grassi liberi (FFA) e glicerolo, con piccoli accumuli di mono e digliceridi. La glicerina, successivamente, viene fermentata rapidamente ad acido propionico. Sono stati identificati ben 74 ceppi batterici in grado di idrolizzare i legami esterei (Fay et al., 1990) ed alcuni di essi, tra i quali *A. lipolytica* e *fibrisolvens*, hanno evidenziato bassa attività idrolitica, mentre altri ceppi dotati di attività esterasica, non necessariamente sono risultati in grado di idrolizzare gli esteri lipidici.

Infatti, solo alcuni dei numerosi batteri ruminali con attività esterasica (inclusi i 30 ceppi di *B. fibrisolvens*) possono idrolizzare gli acidi grassi a catena lunga (LCFA). Gli acidi grassi possono provenire, oltre che dall'idrolisi enzimatica dei trigliceridi, anche da quella dei galattolipidi e fosfolipidi ad opera di diverse galattosidasi e fosfolipasi (fosfolipasi A, fosfolipasi C, lisofosfolipasi e fosfodiesterasi) prodotte dai microrganismi ruminali (Jenkins, 1993).



Figura 5-. Lipolisi e bioidrogenazione.



### 3.1.2 La Bioidrogenazione

La durata dell'emivita degli UFA liberi nel contenuto ruminale è relativamente breve a causa della loro rapida idrogenazione alla forma satura da parte dei microrganismi. E' stato stimato che la riduzione degli acidi grassi polinsaturi (PUFA) è mediamente compresa fra il 60 ed il 90%. Malgrado l'argomento sia ancora dibattuto, sembra che tale processo venga utilizzato dai microrganismi per proteggersi dagli effetti tossici degli UFA. Questo processo

riduttivo contribuisce in piccola parte al riciclo dell'idrogeno metabolico poiché a tale scopo ne viene utilizzato solo l'1-2% (Czerkawski, 1984). Nel caso degli acidi grassi insaturi, che contengono uno dei doppi legami in posizione *cis* 12 (ad esempio l'acido linoleico *cis* 9, *cis* 12 C18:2 e l'acido  $\alpha$ -linolenico *cis* 9, *cis* 12, *cis* 15 C18:3), il primo step nel processo di bioidrogenazione consiste in una reazione enzimatica di isomerizzazione che converte tale legame in un legame *trans* 11 (Figura 5). L'isomerasi sembrerebbe funzionare solo in presenza della funzione carbossilica libera e nel caso particolare degli acidi grassi polinsaturi (PUFA), del diene isolato *cis* 9, *cis* 12. La presenza del carbossile libero rende la lipolisi un pre-requisito per la successiva riduzione; infatti, la lipolisi può essere considerata il "rate determining step" dell'intero processo, cioè lo stadio della reazione che ne determina la cinetica. Il passaggio di piccole quantità di acidi grassi polinsaturi attraverso la barriera ruminale può essere dovuto, pertanto, da una mancata lipolisi. Dopo che si è formato il legame in posizione *trans* 11, una reduttasi microbica opera l'idrogenazione del legame in posizione *cis* 9. La quantità di *trans* 11 C18:1 ridotto a C18:0 viene influenzata dalle condizioni ruminali e dalla concentrazione di acido linoleico (LA), che inibisce irreversibilmente il processo (Harfoot et al., 1973). Moore et al. (1969), infatti, hanno suggerito che grandi quantità di LA non esterificato bloccano il secondo step della bioidrogenazione; ciò non avverrebbe, invece, nel caso in cui tale acido grasso fosse presente in forma esterificata. Quando il contenuto in fibra della razione diminuisce a favore di un più elevato tasso di concentrato, si riduce il numero dei batteri cellulosolitici i quali, come specificato, sono responsabili anche dei processi lipolitici che rappresentano il prerequisito delle bioidrogenazioni. Quindi, una razione ricca in fibra sembrerebbe favorire la quota dei lipidi alimentari che riescono ad attraversare la barriera ruminale senza subire riduzione. In questo senso il maggior beneficio è tratto dall'acido oleico (*cis* 9 C18:1, OA) e dal LA che sono gli acidi grassi maggiormente rappresentati nelle granelle di cereali.

Altri fattori dietetici che diminuiscono la lipolisi e la bioidrogenazione ruminale sono rappresentati dall'inclusione di foraggi ad elevato stadio di

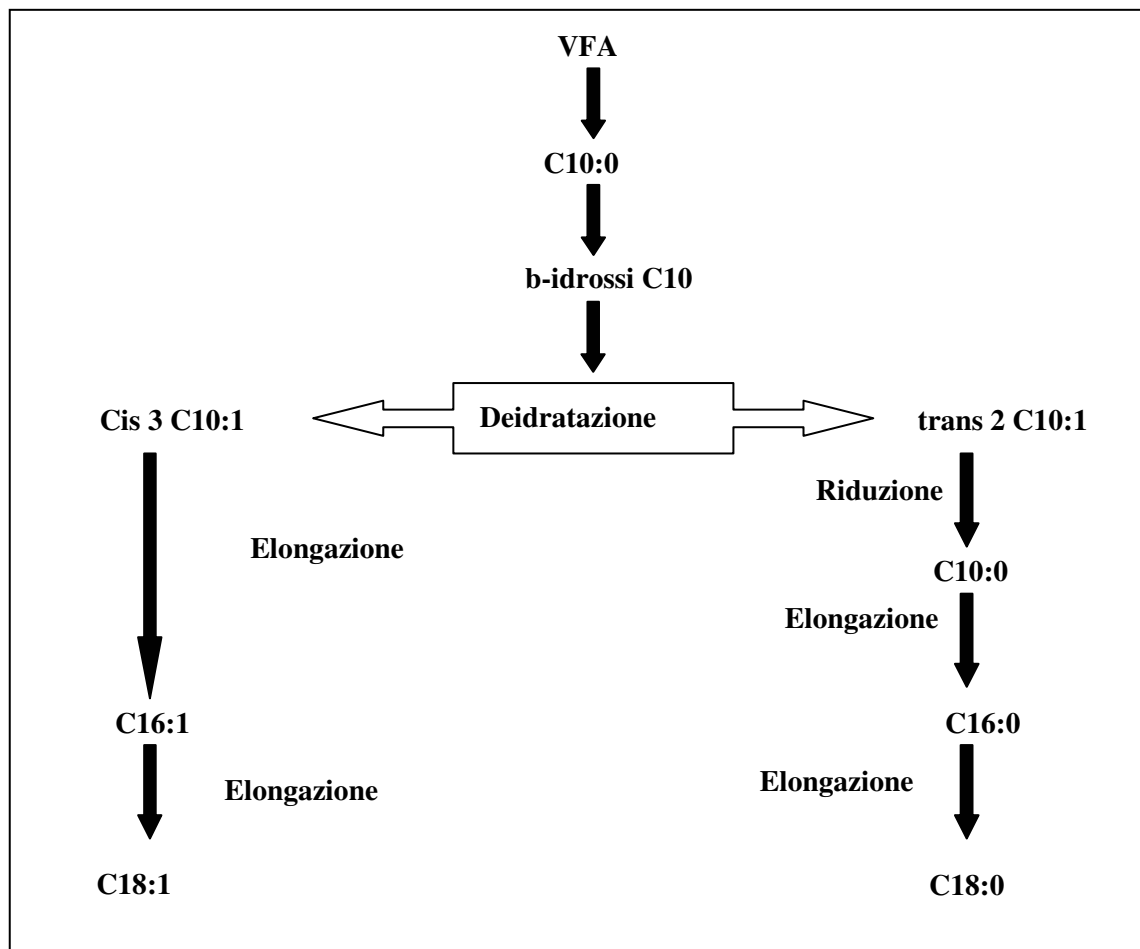
maturazione e di alimenti troppo finemente macinati. In quest'ultimo caso, diminuisce l'aderenza dei batteri sulla superficie delle particelle stesse ed aumenta la loro velocità di *transito* attraverso la barriera ruminale, diminuendo il tempo di esposizione all'attività batterica.

Infine, la quantità ed il tipo di grasso aggiunto alla dieta sono altri fattori in grado di influenzare la trasformazione dei lipidi nel rumine, ma questo aspetto verrà trattato in un paragrafo a parte.

### *3.1.3 Sintesi degli acidi grassi microbici*

I lipidi contenuti nei batteri ruminali sono circa il 10-15% della sostanza secca e provengono in parte dall'alimento degradato (LCFA) ed in parte dalle sintesi *ex novo* che avvengono nelle cellule microbiche (figura 6). Il contributo di ciascuna di queste vie dipende dal contenuto di grasso nella dieta e dalle specie batteriche presenti nel liquido ruminale (Jenkins, 1993). Se la concentrazione di grasso nella dieta è elevata, viene favorito il trasporto dei lipidi all'interno delle cellule batteriche, dove contribuiscono a formare goccioline di grasso che restano immerse nel citoplasma. La sintesi *ex novo* degli acidi grassi conduce prevalentemente alla formazione dell'acido stearico (C18:0) e di acido palmitico (C16:0) in un rapporto di 2:1 (Bauchart et al., 1990). E' da notare, inoltre, che i microrganismi utilizzano gli acidi grassi prevalentemente per formare i fosfolipidi di membrana, in piccola parte, impiegano anche acidi grassi non esterificati (NEFA), mentre non sono in grado di immagazzinare trigliceridi (Viviani, 1970). Studi approfonditi su i meccanismi biosintetici hanno rivelato che l'assorbimento da parte dei batteri ruminali di acetato e glucosio marcati con  $^{14}\text{C}$  conduce alla sintesi di acidi grassi non ramificati caratterizzati da un numero pari di atomi di carbonio, mentre il propionato ed il valerato, anch'essi marcati con  $^{14}\text{C}$ , portano alla sintesi di LCFA con la catena carboniosa lineare, ma con un numero dispari di atomi di carbonio. Se, al contrario, si utilizzano come precursori isobutirrato, isovalerato e 2-metilbutirrato si osserva la sintesi di acidi ramificati nella forma *iso* ed *anteiso*.

Figura 6 - Sintesi microbica degli acidi grassi saturi e monoinsaturi.



Nei batteri, quest'ultima classe di lipidi rappresenta circa il 20% degli acidi grassi totali ed il 30% di quelli contenuti nei fosfolipidi. Gli acidi grassi monoinsaturi (MUFA), che costituiscono circa il 15-20% degli acidi microbici, vengono sintetizzati per via anaerobia. In questa via, il  $\beta$ -idrossidecanoato viene deidratato in  $\beta,\gamma$  formando un doppio legame in posizione 3 e con isomeria geometrica del tipo *cis*, anziché seguire l'eliminazione in  $\alpha,\beta$  che porterebbe alla formazione dell'isomero *trans* 2. Con il doppio legame in posizione *cis* 3, la riduzione successiva, ad opera della C10 enoil redattasi, non può avvenire permettendo l'elongazione della catena fino al C16:1 e C18:1 (figura 6). Quest'ultimo si può anche formare per desaturazione, ad opera di un enzima desaturasico presente nel liquido ruminale (Figura 6) (Jenkins, 1993). Nel rumine

solo i cianobatteri sono in grado di sintetizzare i PUFA, mentre gli altri microrganismi possono solo assorbirli dal liquido ruminale e, come nel caso dei protozoi, incorporarli sottoforma di lipidi di membrana.

#### *3.1.4 Bilancio lipidico nel rumine*

Ogni chilogrammo di sostanza secca consumato da un ruminante contiene, in genere, circa il 4% di grasso grezzo. Nel caso dei foraggi solo il 40% è costituito da acidi grassi, mentre nelle granelle tale percentuale supera il 70% (Palmquist et al., 1980). Nel rumine, la perdita di acidi grassi è trascurabile, tuttavia, sono state ipotizzate alcune vie metaboliche che porterebbero alla perdita di acidi grassi dal fluido ruminale. Infatti, l'acido oleico incubato nelle cellule epiteliali del rumine viene assorbito da questo tessuto per il 31.5% e trasportato nel plasma per l'8.2% (Jenkins, 1993); Il palmitico, invece, viene metabolizzato velocemente a corpi chetonici e convertito a C15:0 mediante  $\alpha$ -ossidazione e a C13:0, C11:0 con la  $\beta$ -ossidazione (Jesse et al., 1992). Inoltre, più del 90% degli acidi grassi con meno di 14 atomi di carbonio verrebbero assorbiti dalle pareti ruminali. E' stato osservato che, nel passaggio degli alimenti dalla bocca al duodeno, la perdita di lipidi più alta avviene più frequentemente con diete grassate, rispetto a quanto si verifica in presenza di diete a basso contenuto in lipidi totali (LT). La presenza dei lipidi nella dieta e la quantità di sostanza organica digerita sarebbero, infatti, gli unici fattori che influenzano le sintesi lipidiche dei microrganismi. In conclusione, mediamente lo 87% degli acidi grassi consumati arriva al duodeno e la quota mancante è spesso compensata dalle sintesi ex novo dei microrganismi ruminali, stimata in 15 g per chilo di sostanza secca digerita nel rumine. Le cause delle perdite sono ascrivibili al metabolismo lipidico delle cellule dell'epitelio ruminale ed alle degradazioni microbiche (Jenkins, 1994).

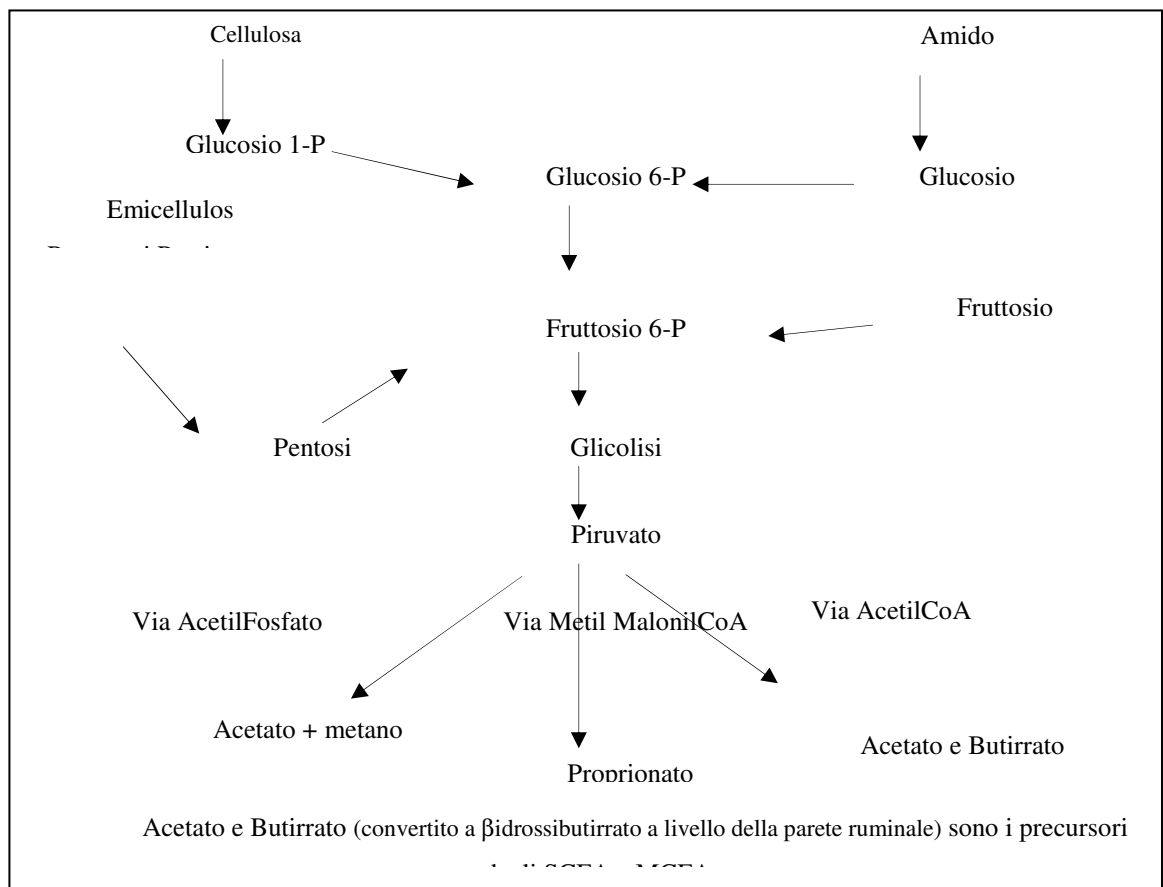
### **3.2 La sintesi mammaria degli acidi grassi**

Come accennato precedentemente i lipidi del latte dei ruminanti possono avere origine alimentare o derivare dalla sintesi de novo operata dalle cellule dell'epitelio mammario a partire dagli acidi grassi volatili di provenienza ruminale (Bauman et al., 2001). In effetti, come è noto le popolazioni microbiche ruminali degradano gli alimenti assunti dagli animali ed è proprio da tale processo che ha origine la fermentazione dei carboidrati con, la conseguente, formazione degli acidi grassi volatili (VFA). Tali VFA sono le forme anioniche dell'acido propionico, acetico e butirrico.

I tre VFA, hanno origine da tre processi metabolici diversi, ma tutti hanno come punto di partenza la sintesi del fruttosio 6-fosfato e, successivamente, del piruvato (figura 7). Da quest'ultimo si ottiene l'acetato attraverso la via dell'Acetil-fosfato, il propionato attraverso la via del Metilmalonil-CoA ed il butirrato tramite la via dell'Acetil CoA. L'acetato ed il butirrato sono i precursori degli acidi grassi a media e corta catena (SCFA e MCFA) nel latte e nel tessuto adiposo (Chilliard et al., 2000). Al contrario dei monogastrici, nei ruminanti il sito di maggiore sintesi degli acidi grassi non è il fegato, ma il tessuto adiposo. Durante la lattazione, invece, è la ghiandola mammaria a svolgere la maggiore attività biosintetica (Vernon et al., 1988).

I meccanismi responsabili della sintesi degli acidi grassi sono due: uno citoplasmatico, che rappresenta la via principale e con maggiore attività, il secondo, invece, è quello mitocondriale che perfeziona il precedente (Secchiari et al., 2002).

Figura 7 – Vie metaboliche di formazione dei VFA a livello ruminale

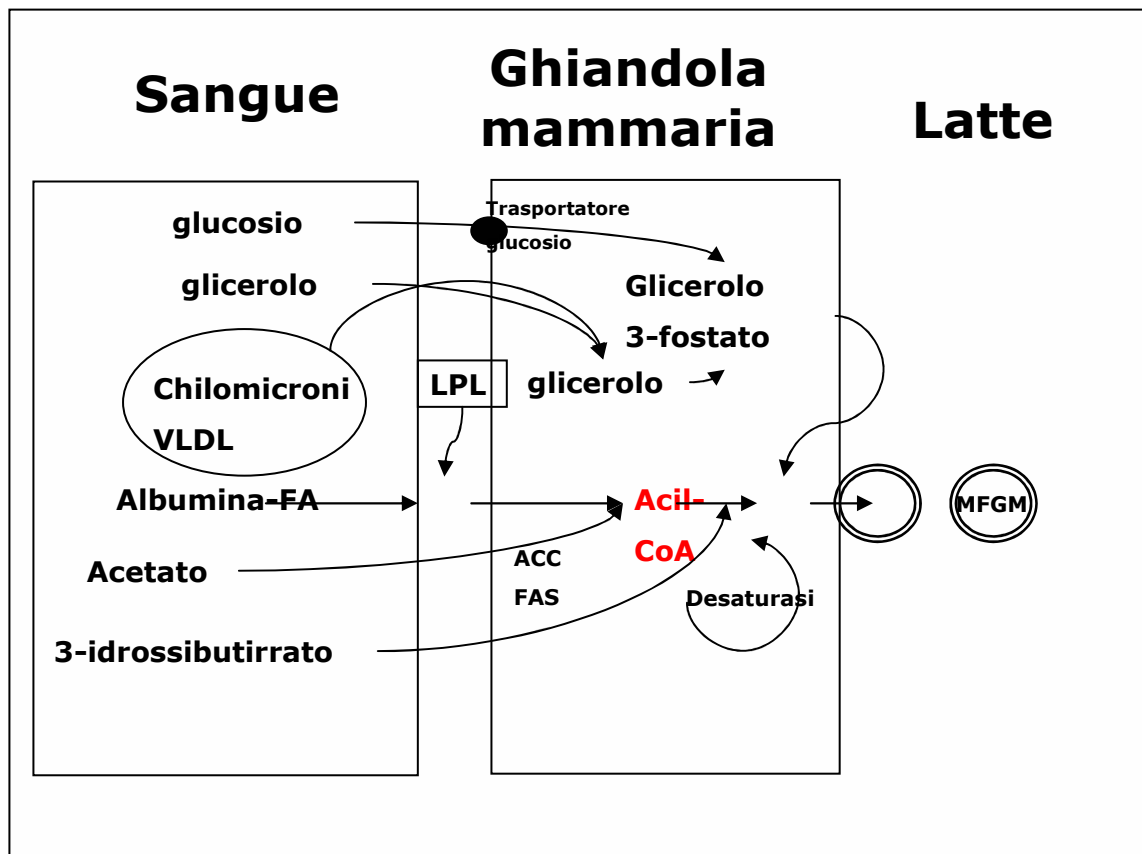


La sintesi degli acidi grassi fino a 16 atomi di carbonio avviene nel citoplasma; il processo metabolico vede l'intervento di alcuni enzimi chiave, quali l'Acetil CoA Carbossilasi (ACC) e la Sintasi degli acidi grassi (FAS) (Chilliard et al., 2000). L'ACC catalizza la formazione del malonil-CoA a partire dall'acetil-CoA, e rappresenta l'enzima chiave del processo della sintesi degli acidi grassi. Il FAS, invece, catalizza la condensazione ciclica del malonil-ACP con molecole di acetato (Barber et al., 1997). La reazione di condensazione si ripete per un certo numero di volte sino alla formazione del palmitoil-CoA (C16), che rappresenta in genere il prodotto finale della sintesi. Nella ghiandola mammaria, al contrario degli altri tessuti, la sintesi può terminare anche con il miristoil-CoA (C14), mentre l'acido palmitico non può essere convertito in acido stearico (C18) (Moore et al., 1981). Al contrario, negli altri tessuti la sintesi mitocondriale opera l'allungamento dell'acido palmitico, sino ad arrivare a catene aciliche di 22 atomi

di carbonio. I microsomi, invece, sono il sito dove gli acidi grassi possono essere allungati e/o desaturati, nel caso in cui abbiano almeno 18 atomi di carbonio.

Gli acidi grassi preformati, provenienti dalla dieta o dalle riserve corporee, vengono prelevati direttamente dal circolo sanguigno se sono presenti nella forma non esterificata, oppure captati dall'enzima Lipoproteinlipasi (LPL), a livello della membrana basale della cellula alveolare se sono presenti nei chilomicroni o nelle VLDL (figura 8).

Figura 8 – Metabolismo cellulare degli acidi grassi nella mammella dei ruminanti



Il prelievo mammario di queste lipoproteine è di norma correlato con la loro concentrazione ematica (Gagliostro et al., 1991), fino a valori pari a 0.4mM/ml, allorché l'attività dell'LPL diventa limitante (Baldwin et al., 1980). Le cellule della ghiandola mammaria, benché non possano sintetizzare acidi grassi a catena più



lunga di 16 atomi di carbonio, mediante l'enzima Stearoyl-CoA desaturasi (SCD), che introduce un doppio legame in posizione  $\Delta 9$  della catena carboniosa, riescono a convertire una notevole quantità di acido stearico in acido oleico (Kinsella, 1972). Tale enzima introduce un doppio legame in posizione *cis*- $\Delta 9$  della catena carboniosa. I mammiferi hanno perso la capacità di introdurre doppi legami tra la posizione n-9 e il carbonio  $\alpha$ ; non possono quindi sintetizzare gli acidi linoleico e  $\alpha$ -linolenico capostipiti, rispettivamente, della serie n-6 e n-3. Gli acidi grassi essenziali sono assorbiti inalterati a livello intestinale, ma possono essere allungati e desaturati nelle cellule.

Gli acidi grassi, sia quelli di neo-sintesi che quelli provenienti dalla dieta, sono utilizzati dalla ghiandola mammaria e dagli altri tessuti per la sintesi dei trigliceridi e dei fosfolipidi.

### **3.3 La biosintesi dei CLA.**

Come è noto nei poligastrici la sintesi dei CLA avviene sia a livello ruminale, a seguito del processo di idrogenazione dell'acido linoleico contenuto nella dieta, sia a livello dei tessuti a partire dal C18:1*trans*11 (VA), un altro intermedio della bioidrogenazione ruminale derivato dalla componente lipidica insatura di origine alimentare (Bauman et al., 2001).

#### **3.3.1 La Sintesi ruminale dei CLA**

La componente lipidica apportata dai foraggi, deriva sostanzialmente dai trigliceridi e dai fosfolipidi le cui composizioni acide sono caratterizzate da una prevalenza degli acidi linoleico e  $\alpha$ -linolenico. Nel caso delle granelle di cereali, invece, a pesare maggiormente è la frazione lipidica apolare (trigliceridi) che apporta soprattutto acido oleico e linoleico.

Una volta giunti nel rumine i trigliceridi ed i fosfolipidi subiscono una prima azione da parte della microflora batterica la quale, a mezzo di opportune

lipasi, scinde i legami estere esistenti tra i singoli acidi grassi ed il glicerolo. Gli acidi grassi così liberati sono sottoposti ad una massiccia idrogenazione in cui assume un ruolo determinante la microflora batterica; i protozoi, invece, parrebbero avere una minore importanza (Bauman et al., 2001). Per lungo tempo si è creduto che l'unico batterio in grado di idrogenare gli acidi grassi insaturi nel rumine fosse il *Butyrivibrio fibrisolvens*. Oggi è appurato che il complesso meccanismo di idrogenazione ruminale avviene in diversi steps e che la sequenza completa di bioidrogenazione non coinvolge un solo gruppo batterico. A tal proposito la microflora batterica è suddivisibile in due gruppi a seconda dei prodotti finali delle reazioni che li riguardano (Bauman et al., 2001):

Batteri del gruppo A: utilizzano come substrato gli acidi linoleico ed  $\alpha$ -linolenico e generano come prodotti finali il C18:1 *trans*11;

Batteri del gruppo B: utilizzano come substrato il C18:1 *trans*11 ed hanno come prodotto di reazione il C18:0 (SA).

L'idrogenazione ruminale avviene solo su acidi grassi che contengono doppi legami in posizione *cis*9,*cis*12 come gli acidi linoleico e linolenico. Come si nota dallo schema, nel quale si riporta l'idrogenazione a carico dell'acido linoleico, il primo passaggio del processo è rappresentato dall'isomerizzazione del legame in posizione 12. L'azione dell'isomerasi è piuttosto singolare in quanto questa non necessita di un cofattore e la sua azione avviene al centro di una lunga catena carboniosa piuttosto lontano dal gruppo funzionale attivato. E' comunque appurato che tale enzima è legato alle membrane cellulari dei batteri ed ha come unico substrato di reazione gli acidi grassi con doppio legame in posizione *cis*9, *cis*12 ed un gruppo carbossilico "libero".

In sostanza l'isomerasi dei batteri del gruppo A "prepara" l'acido grasso libero, con doppi legami in posizione *cis*9,*cis*12, per la successiva azione dei batteri del gruppo B, "spostando" il legame dalla posizione 12 alla posizione 11, dopo averlo convertito dalla forma *cis* a quella *trans*.

Nel caso dell'acido linoleico il prodotto di questo step è, quindi, il C18:2 *cis*9,*trans*11, ovverosia il CLA maggiormente rappresentato negli alimenti provenienti dai ruminanti.

Nel caso dell'acido linoleico il successivo step consiste nella riduzione del legame in posizione 9 da parte di una riduttasi batterica con produzione del C18:1 *trans*11 che subisce un'ulteriore riduzione in conseguenza della quale si produce l'acido saturo corrispondente, vale a dire il C 18:0 (SA) (Bauman et al., 2001).

Numerosi studi hanno evidenziato che, successivamente all'isomerizzazione iniziale del legame in posizione 12, gli steps che conducono all'ottenimento di C18:1 *trans*11, procedono piuttosto rapidamente, mentre quello successivo, da C18:1 *trans*11 a C18:0 si verifica, invece, piuttosto lentamente (Bauman et al., 2001).

La lentezza con cui avviene l'ultima riduzione, determina un accumulo di acido vaccenico (VA).

La riduzione dell'acido  $\alpha$ -linolenico (18:3 *cis*9, *cis*12, *cis*15) segue in tutto e per tutto le vie metaboliche riportate sopra, con l'eccezione che il primo prodotto intermedio è, ovviamente, un isomero coniugato dell'acido  $\alpha$ -linolenico, il C18:3 *cis*9, *trans*11, *cis*15 (Destailats et al., 2005).

Pertanto, analogamente a quanto avviene per l'idrogenazione dell'acido linoleico, tale intermedio di reazione subisce due riduzioni successive: la prima, che riguarda i due doppi legami *cis* posti in posizione 9 e 15 e porta alla formazione, anche in questo caso, dell'acido vaccenico (C18:1 *trans*11); la seconda, che procede più lentamente della prima e porta alla formazione del prodotto finale: l'acido stearico (C18:0). Pertanto, se da un lato l'acido  $\alpha$ -linolenico non contribuisce direttamente alla formazione del CLA a livello ruminale, riveste comunque un ruolo importante nel determinare la quantità totale dei CLA nel latte e/o nella carne, in quanto concorre alla formazione del C18:1*trans*11 che, come sarà meglio spiegato in seguito, è un elemento molto importante per la sintesi endogena dei CLA stessi.

Il processo di idrogenazione batterica ruminale dei PUFA è dotato di meccanismi di autoregolazione e, per evitare squilibri nel metabolismo lipidico batterico, risponde in modi diversi alle possibili variazioni delle condizioni ambientali in cui esso avviene.

L'azione dell'isomerasi batterica che catalizza il primo step è, ad esempio, inibita da elevate concentrazioni dei substrati di reazione, ossia dagli acidi linoleico e  $\alpha$ -linolenico; mentre, elevate concentrazioni di PUFA n-3 nella dieta inibiscono sia la riduttasi batterica che catalizza il passaggio dal C18:2 *cis*9, *trans*11 al C18:1 *trans*11, che quella che catalizza l'ultima riduzione dal C18:1 *trans*11 a C18:0. Tale inibizione sembra potersi ricondurre a probabili fenomeni di competizione enzimatica, più che ad una generale modificazione dell'ambiente ruminale da parte dei PUFA n-3 (Enser et al., 1999). La riduttasi che catalizza il passaggio C18:2 *cis*9, *trans*11 a C18:1 *trans*11 subisce, invece, un'inibizione a feedback da parte del C18:1 *trans*11 stesso (Enser et al., 1999). Inoltre, quando il pH ruminale subisce una riduzione conseguente ad una dieta con basso rapporto foraggi/concentrati, si creano le condizioni per la produzione in quantità significative dell'isomero CLA C18:2 *trans*10, *cis*12 e del C18:1 *trans*10 a discapito del C18:1 *trans*11. Si pensa che in tale processo sia implicata una specifica isomerasi batterica *cis*9,*trans*10, che determina la formazione dell'isomero CLA *trans*10, *cis*12 come prodotto del primo passaggio.

### 3.3.2 Sintesi dei CLA a livello dei tessuti.

In molti studi è stata evidenziata una forte correlazione tra i *trans* 18:1 ed i CLA. Con il miglioramento delle tecniche analitiche si è appurato che tale forte correlazione riguardava soprattutto il C18:1 *trans*11 e C18:2 *cis*9, *trans*11 (Bauman et al., 2001).

La correlazione tra i due isomeri è stata ritrovata sia nel latte che nella carne: Enser et al. (1999) riportano nella carne una correlazione tra *trans* 18:1 e CLA con  $r=0.62$  ed affermano che Jiang et al. (1996) e Jahreis et al. (1999) hanno riscontrato una simile correlazione nel latte. Bauman et al. (2006), preso atto di queste forti correlazioni positive e considerando anche il fatto che a livello ruminale si rende disponibile per l'assorbimento nei tessuti una grande quantità di C18:1*trans*11, hanno ipotizzato che i CLA potrebbero formarsi anche a livello dei tessuti.

Gli autori affermano che il CLA 18:2 *cis*9,*trans*11 possa formarsi a livello dei tessuti per l'azione desaturante dell'enzima  $\Delta$ 9 desaturasi (figura 8). Tale sistema di desaturazione è un complesso multienzimatico che coinvolge NADH-citocromo b5 riduttasi, citocromo b5, acil-CoA sintasi e  $\Delta$ 9 desaturasi (Ackman, 1999; Ntambi, 1995) (Figura 9).

Figura 8 – Schema del processo biosintetico dei CLA a livello tissutale

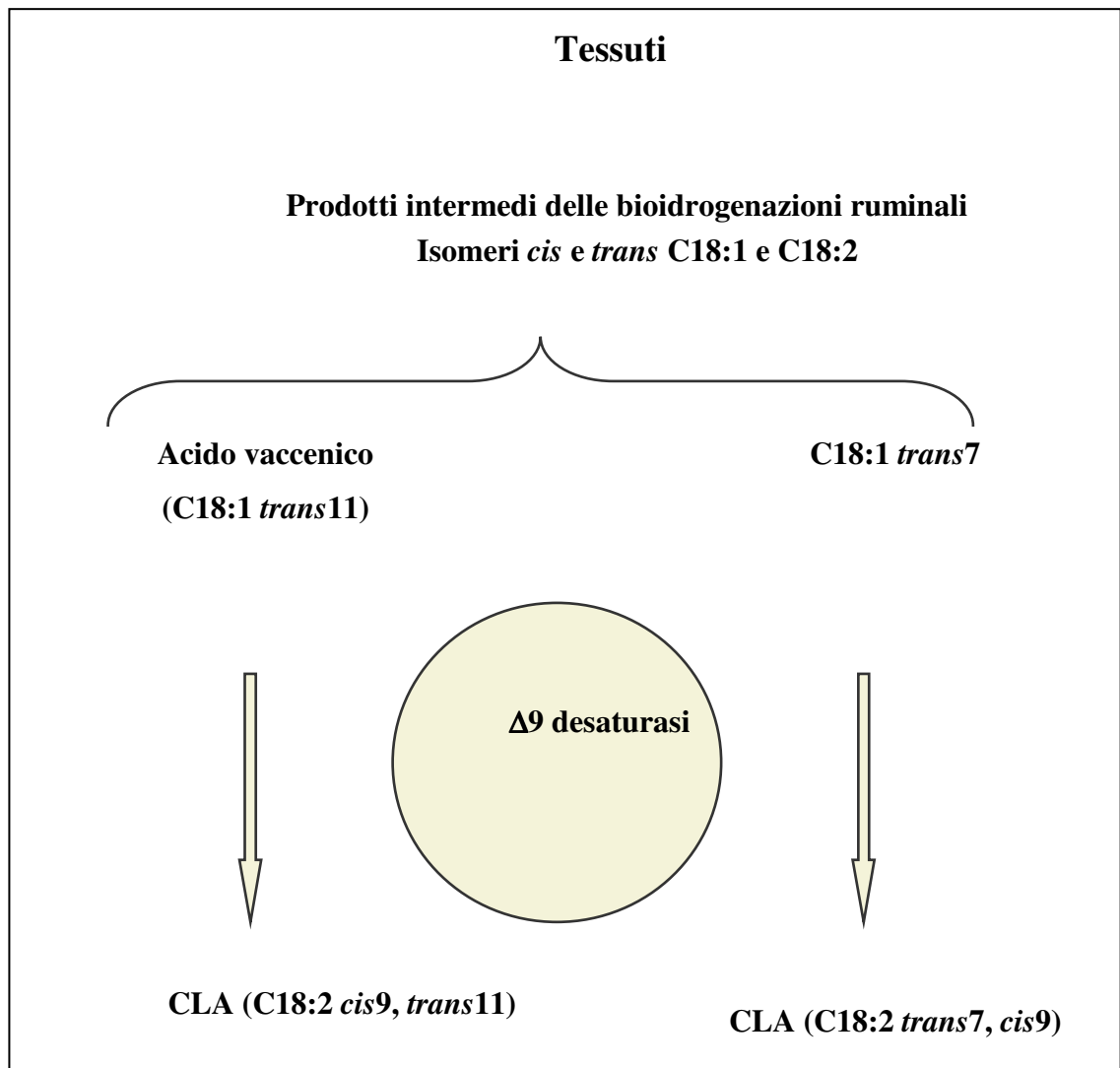
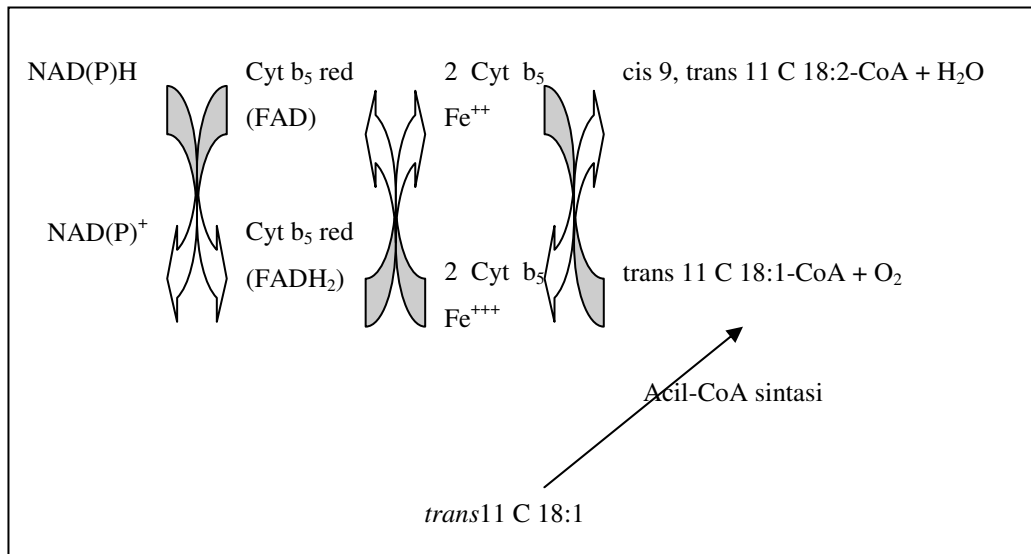


Figura 9 - Sistema enzimatico implicato nella desaturazione dei FA



Questo sistema enzimatico consente di introdurre un doppio legame *cis* in corrispondenza dei carboni in posizione 9 e 10 della catena carboniosa di un acido grasso. I principali substrati di reazione sono lo stearoil-CoA ed il palmitoil-CoA che sono utilizzati per la formazione di acidi grassi a più elevato livello di insaturazione, i quali poi possono essere incorporati nei trigliceridi e nei fosfolipidi.

L'incorporazione di tali FA nei fosfolipidi assolve un importante ruolo fisiologico, in quanto essi contribuiscono al mantenimento dell'integrità funzionale delle membrane cellulari. Il sistema enzimatico della  $\Delta^9$  desaturasi può utilizzare come substrato di reazione anche numerosi altri acidi e tra questi pure il cui il C18:1 *trans*11. In quest'ultimo caso, poiché il sistema aggiunge un doppio legame *cis* in posizione 9, il prodotto finale di reazione è il C18:2 *cis* 9, *trans* 11 (CLA) (Ntambi, 1995; Bauman et al., 2001).

L'attività dell'SCD può essere saggiata attraverso il campionamento di frammenti di tessuto, anche se, tale metodo analitico risulta essere, ad oggi, dispendioso ed invasivo. In alternativa, l'attività di tale enzima può essere stimata utilizzando opportune equazioni incentrate sul rapporto prodotto/substrato ed espresse come di seguito:

prodotto della desaturasi / [prodotto della  $\Delta 9$  desaturasi + substrato della  $\Delta 9$  desaturasi] (Malau-Aduli, et al., 2000).

Tale equazione può essere applicata a quattro paia di prodotti/substrati: C14:1/C14:0; C16:1/C16:0; C18:1 *cis*9/C18:0 e RA/VA.

Tuttavia il rapporto che meglio riesce a stimare l'attività dell'SCD sembra essere il C14:1/C14:0, in funzione del fatto che il C14:0 del latte deriva quasi esclusivamente dalla sintesi mammaria e, di conseguenza, la quasi totalità dell'acido miristoleico ivi presente deriva della sintesi mammaria, per azione appunto dell'SCD (Bernard et al., 2006). Il sito di sintesi endogena dei CLA varia a seconda dello stato fisiologico degli animali, tanto che nei ruminanti in fase di accrescimento sembra essere il tessuto adiposo, mentre in quelli in fase di lattazione è rappresentato dalla mammella (Bauman et al., 2001).

Come più volte ricordato i CLA sono un pool di acidi grassi ed i più rappresentati negli alimenti ottenibili dai ruminanti (carne e latte) sono il *cis*9, *trans*11 ed il *trans*10, *cis*12. I siti di sintesi endogena di questi 2 isomeri sembrano poter essere diversi. In effetti, date le conoscenze attuali, si può affermare che il C18:2 *cis*9, *trans*11 possa essere sintetizzato sia a livello ruminale, che tissutale, mentre l'unico possibile sito di sintesi del *trans*10, *cis*12 (e di tutti gli altri isomeri eventualmente presenti) pare essere il rumine.

### **3.4 Il colesterolo: struttura chimica, biosintesi e degradazione**

Come accennato precedentemente, il colesterolo è uno sterolo di fondamentale importanza per il ruolo fisiologico svolto sia relativamente al mantenimento della funzionalità di membrana, sia come fonte di ormoni steroidei ed acidi biliari (Grundy S.M., 1994). Il colesterolo viene prodotto nella maggior parte dei tessuti, ma principalmente a livello del fegato e della mucosa intestinale, attraverso una serie di circa 20 reazioni che hanno origine a partire dall'acetato.

In effetti, l'acetato viene condensato in acetoacetato, che a sua volta si lega a un altro residuo di acetato per formare l'idrossimetilglutaril coenzima A (HMG-CoA). La conversione dell'HMG-CoA in acido mevalonico, catalizzata dall'enzima HMG-CoA reduttasi, riduce la velocità di sintesi del colesterolo. L'acido mevalonico viene interessato da una serie di reazioni di condensazione che danno origine a un idrocarburo a catena lineare, lo squalene, il quale subisce poi una “ciclizzazione” generandosi uno sterolo, il lanosterolo, che a sua volta viene convertito in colesterolo (Grundy S.M., 1994).

La velocità di sintesi del colesterolo dipende dalla sua concentrazione all'interno delle cellule, in quanto, ad esempio, un aumento della sua concentrazione cellulare provoca la soppressione dell'attività dell'HMG-CoA reduttasi. Tale meccanismo di controllo a feedback consente di mantenere la concentrazione cellulare di colesterolo a livelli ottimali. Quando all'interno delle cellule si accumulano quantità eccessive di colesterolo, esso viene parzialmente esterificato con un acido grasso. L'enzima acilcolesterolaciltransferasi (ACAT), centrale nel metabolismo del colesterolo, consente, quindi, di immagazzinare temporaneamente il colesterolo come estere, in attesa del suo utilizzo a livello cellulare (Grundy S.M., 1994).

Il fegato promuove l'escrezione del colesterolo in 2 modi:

mediante conversione parziale del colesterolo epatico in acidi biliari “primari”, l'acido colico e l'acido chetodesossicolico;

mediante secrezione diretta del colesterolo nella bile.

La secrezione diretta è resa possibile dal potere solubilizzante degli acidi biliari. Sia il colesterolo sia gli acidi biliari vengono convogliati nell'intestino attraverso il tratto biliare. Circa il 40-60% del colesterolo intestinale viene riassorbito e la parte rimanente viene escreta attraverso le feci. Il colesterolo viene assorbito quasi esclusivamente nella parte superiore dell'intestino tenue. Gli acidi biliari (circa il 98%) vengono normalmente riassorbiti a livello della parte distale dell'intestino tenue. Solo una porzione trascurabile degli acidi biliari presenti nell'intestino raggiunge il colon e viene escreta attraverso le feci.



Gli acidi biliari vengono veicolati nuovamente nel fegato per mezzo della circolazione portale ed estratti quasi completamente al primo passaggio. Vengono, quindi, secreti rapidamente nella bile per completare la circolazione enteroepatica.

Nel fegato la conversione del colesterolo in acidi biliari viene inibita da tali acidi mediante soppressione della reazione di limitazione della velocità di sintesi degli acidi biliari, detta 7-alfa-idrossilazione del colesterolo. La velocità del flusso degli acidi biliari nel fegato regola in questo modo il catabolismo del colesterolo e pertanto ne influenza indirettamente le concentrazioni a livello epatico (Grundy S.M., 1994).

## **4 STRATEGIE IMPIEGATE PER LA MODIFICAZIONE DELLA FRAZIONE LIPIDICA DEL LATTE OVINO**

Da quanto esposto fino ad ora, appare evidente che il grasso dei ruminanti presenta alcune componenti con azione positiva sulla salute umana, affianco ad altre che rappresentano, se assunte in eccesso, dei fattori di rischio. Per questo motivo nel tempo sono state proposte diverse strategie per modificare la composizione del grasso relativamente alla possibilità di innalzare il contenuto delle molecole ad azione positiva ed abbassare quello delle componenti di rischio. Come accennato in precedenza la strategia più efficace per modificare la frazione lipidica del latte è rappresentata da interventi mirati sull'alimentazione degli animali. In estrema sintesi tali interventi possono essere raggruppati in due grandi categorie:

- integrare la razione con alimenti ricchi di grassi polinsaturi.

- massimizzare l'assunzione di foraggio verde da parte degli animali in lattazione

## **4.1 Integrazione della dieta con fonti lipidiche ed effetti sulla quantità e sulla qualità del latte.**

I lipidi possono essere aggiunti alla dieta delle diverse specie ad interesse zootecnico ed, in particolar modo, a quelle dei ruminanti, al fine di soddisfarne i fabbisogni energetici specifici durante la fase iniziale della lattazione, di aumentare il contenuto di grasso totale del latte e di modificarne il profilo acido (Palmquist e Jenkins, 1980). L'interesse mostrato dalla ricerca di settore relativamente all'impiego di fonti lipidiche per la grassatura della dieta dei ruminanti ha radici lontane. In effetti, nel 1907, agli albori della zootecnia moderna, Kellner studiando i dati provenienti da dieci differenti stazioni sperimentali europee affermò che non vi erano effetti benefici sulla produzione del latte dovuti all'integrazione della dieta con grassi (Palmquist e Jenkins, 1980). Successivamente, tra il 1920 ed il 1940, Maynard e Loosli osservarono un miglioramento nella produttività complessiva (dal 2 al 10%) di bovine la cui razione avesse un contenuto medio di lipidi totali pari a circa il 4-7%, rispetto alle performance mostrate da vacche alimentate con razioni con un tenore lipidico decisamente inferiore e pari a circa l'1-3% (Palmquist e Jenkins, 1980). Nel 1960, inoltre, Warner osservò che i lipidi sembravano ridurre la digeribilità della fibra negli ovini da latte e carne (Palmquist e Jenkins, 1980).

In seguito, Smith (citato da Palmquist, 1994) ha riassunto, come segue, il molteplice ruolo svolto dalle fonti lipidiche somministrate ai ruminanti a mezzo della razione:

i) consentono di incrementare la quota di energia lorda assunta dagli animali, quando la capacità d'ingestione è fattore limitante ii) permettono di incrementare la quota assunta di energia netta, ottimizzando la dispersione del calore iii) consentono di modificare la frazione lipidica del grasso del latte in termini quali-quantitativi, a mezzo del trasferimento degli acidi grassi dalla dieta al latte iv) consentono di sostituire parte della quota dei carboidrati altamente fermentescibili presenti nella razione.

L'ottenimento degli obiettivi sopra esposti è, però, subordinato a diversi fattori correlati alla natura e digeribilità della fonte lipidica individuata, alla stabilità della stessa, che è funzione dell'attaccabilità ad opera delle popolazioni ruminanti ed all'interazione con l'utilizzazione metabolica degli altri macronutrienti apportati con la razione.

Le razioni, benché grassate, convenzionalmente non contengono più del 3.5% di lipidi totali, di cui una quota variabile compresa tra il 20 e il 50%, in funzione della natura della fonte lipidica impiegata (granella o foraggio), non è rappresentata da acidi grassi. Infatti, l'estratto etereo delle foglie delle piante è costituito prevalentemente da cere cuticulari, pigmenti come la clorofilla ed altro materiale insaponificabile (Palmquist e Jenkins, 1980). Inoltre, numerosi studi di settore hanno evidenziato che nel caso si grassa la razione con fonti lipidiche non ruminanti protette in quantità superiori al 7%, si può assistere, verosimilmente, ad una riduzione dell'ingestione complessiva di sostanza secca (ss) da parte degli animali. I meccanismi fisiologici in grado di spiegare questo fenomeno non sono, ad oggi, ben chiari. Tra le varie ipotesi quelle più accreditate riferiscono che: i) gli alimenti ad alto contenuto lipidico sono forti produttori di *colecistochinine* che hanno la prerogativa di inibire l'ingestione ii) diete ad alto contenuto in FA aumentano il tasso di  $\beta$ -ossidazione nel fegato, determinando una riduzione nell'assunzione di alimento iii) l'assunzione di elevate quantità di lipidi sembra poter indurre la formazione intestinale di importanti quantità di *enterostatina*, che è risultata avere proprietà limitanti l'ingestione iv) l'assunzione di diete ad alto contenuto lipidico favorisce la sintesi di *apolipoproteine A-IV*, che sono responsabili della trasmissione neurosinaptica del segnale di sazietà (Emery, 1992).

L'ipotesi ii) sembra aver trovato conferma, soprattutto relativamente ad animali ad inizio lattazione. Durante questa fase fisiologica, in effetti, gli animali sono biologicamente soggetti a bilancio energetico negativo, dato il forte e repentino incremento dei fabbisogni alimentari e la relativamente bassa capacità d'ingestione. Ciò comporta, generalmente, la mobilitazione delle riserve lipidiche endogene, con il conseguente incremento della concentrazione

plasmatica degli acidi grassi non esterificati (NEFA) che seguono la via della  $\beta$ -ossidazione epatica. La somministrazione di diete ad alto tenore lipidico ad inizio lattazione, quindi, non fa altro che incrementare il coinvolgimento del fegato a mezzo della via metabolica sopra indicata. Nella formulazione di razioni ad alto tenore lipidico è necessario tenere in considerazione che la somministrazione di grassi altera, in modo più o meno evidente in funzione del tenore della grassatura e delle natura della fonte lipidica impiegata, le fermentazioni ruminali che presiedono alla formazione degli AVG. In particolar modo, è stato messo in evidenza che diete grassate agiscono prevalentemente incrementando la quota di propionato, in funzione dell'azione depressoria esercitata dai lipidi prevalentemente a carico delle popolazioni cellulosolitiche, piuttosto che su quelle amilolitiche (Doreau et al., 1991).

L'aggiunta di lipidi alla dieta dei ruminanti, inoltre, può comportare una riduzione delle digeribilità complessiva della fibra, con conseguenti ripercussioni sia in termini di efficienza d'utilizzo delle razioni somministrate, sia di alterazione degli equilibri ruminali. A questo proposito si ricordano le quattro teorie riferite da Devendra e Lewis (1974) relativamente ai meccanismi che sembrano presiedere all'interazione negativa tra grassatura della razione e digeribilità della componente fibrosa: i) l'assemblaggio fisico della matrice fibrosa con quella lipidica sembrerebbe ostacolare l'attacco batterico alla superficie delle particelle di bolo; ii) si ritiene che vi sia una sostanziale modificazione delle popolazioni microbiche ruminali, a causa degli effetti tossici estrinseci dai lipidi della dieta nei confronti degli stessi batteri; iii) si ritiene che si verifichi una certa inibizione dell'attività microbica ruminale, a causa di effetti di superficie esercitati dagli acidi grassi sulle membrane cellulari batteriche; iv) si ritiene che la modificazione a carico del PH ruminale, dovuta alla riduzione della concentrazione cationica, penalizzi l'efficienza e la sopravvivenza di certa parte delle popolazioni microbiche.

In effetti, numerosi studi condotti su colture cellulari pure hanno confermato che gli FA inibiscono i batteri ruminali legandosi ad essi ed, in particolar modo, che a risentirne siano i protozoi. D'altronde, è stato verificato che proprio un

aumento della fibra e la presenza di cationi metallici possono calmierare tale effetto negativo correlato all'assunzione di diete ad alto contenuto lipidico (Czerkawski, 1973; Harfoot et al., 1978; Henderson et al., 1973; Brooks et al., 1954).

La grassatura delle diete somministrate ai ruminanti fino ad un massimo del 5-6% del totale della ss ingerita, normalmente comporta un incremento del contenuto in lipidi totali (LT) del latte. Di contro, il ricorso a diete a maggior contenuto lipidico e con un'elevata percentuale di PUFA, unitamente alla somministrazione di alimenti poveri in fibra, possono determinare cali, anche consistenti, nell'effiezione di grasso nel latte in conseguenza di: i) degli effetti negativi sopra ricordati esercitati dal grasso non protetto sul metabolismo dei batteri cellulosolitici nel rumine (Palmquist, 1994); ii) degli effetti negativi che alcuni acidi grassi a lunga catena esercitano sugli enzimi chiave del metabolismo lipidico della ghiandola mammaria (Barber et al, 1997); iii) dell'effetto negativo che i PUFA esercitano sul prelievo mammario dei lipidi ematici (Palmquist, 1994).

Proprio al fine di calmierare ed evitare i possibili effetti negativi legati alla somministrazioni di diete grassate sulla fisiologia ruminale e sulle performance quali-quantitative di produzione, la ricerca di settore ha focalizzato parte della propria attenzione sulla messa a punto della più opportuna strategia di protezione dei grassi alimentari. In effetti, i lipidi ruminati protetti hanno la proprietà di bypassare, pressoché, inalterati la barriera ruminale, arrivando direttamente all'intestino dove sono degradati ed assorbiti. Tale via metabolica, indotta a mezzo di opportune tecnologie, comporta un incremento netto della concentrazione plasmatica dei trigliceridi che, quindi, si rendono disponibili in maggiori quantità per l'emungimento ematico ad opera della ghiandola mammaria. Così facendo si può operare una modificazione del profilo acidico, per così dire, più mirata e soprattutto non mediata dal metabolismo ruminale che, come accennato precedentemente, così pesantemente insiste sulla natura stereochimica dei lipidi alimentari.

Una delle prime tecniche che sono state realizzate a tal fine, è l'incapsulazione del grasso con proteine e formaldeide (spray-dried). E' stato dimostrato che questo tipo di protezione è più efficace nelle prove in vitro piuttosto che in vivo a causa della masticazione che sicuramente comporta un'alterazione fisica dello stato ex-ante degli alimenti (Doreau et al., 1991). Un altro metodo di protezione ruminale dei lipidi è rappresentato dall'uso di grassi cristallini (prilled fats) che, talvolta, sono assemblati con l'amido. Questi prodotti sono costituiti prevalentemente da acidi grassi allo stato solido ed hanno, quindi, un elevato punto di fusione che li rende insolubili nel liquido ruminale; essi, perciò, passata inalterata la barriera ruminale arrivano nell'intestino dove rimangono disponibili per la digestione e l'assorbimento intestinale. Una tecnica molto utilizzata per la protezione dei lipidi alimentari dalle bioidrogenazioni consiste nella loro conversione in sali di calcio, al fine di renderli insolubili nel liquido ruminale. La loro inattaccabilità da parte dei microrganismi sembra essere correlata al fatto che la funzione carbossilica è, per così dire, "ingombrata" dalla presenza di un catione metallico, le cui dimensioni e la cui densità di carica sono sufficienti per impedire l'aggancio del pacchetto enzimatico responsabile della bioidrogenazione ruminale (Sukhija e Palmquist, 1990). Esperimenti in vitro hanno riportato una degradabilità del 47% per i sali di calcio di olio di palma (Chouinard et al., 1998). I dati di Sukhija e Palmquist (1990) hanno mostrato che la dissociazione dei saponi è direttamente correlata alla diminuzione del pH ruminale ( $< 6$ ) e al grado di insaturazione degli acidi grassi contenuti: i sali di calcio dei PUFA si dissociano molto più rapidamente di quelli di SFA. Se, però, alla razione vengono addizionati dei tamponi come  $\text{NaHCO}_3$  e  $\text{KHCO}_3$  oppure  $\text{MgO}$  aumenta la quota dei trigliceridi plasmatici e il prelievo della ghiandola mammaria (Thivierge et al., 1998).

## **4.2 L'impiego di fonti lipidiche non protette nella dieta di ovini da latte**

L'inclusione di grasso non protetto (sotto forma di oli vegetali o di granella) nelle diete di pecore da latte comporta, nella maggior parte dei casi, un aumento del tenore lipidico del latte e della produzione totale di grasso che, nel caso di semi oleosi, può arrivare a superare il 2% (Schmidely e Sauvant, 2001).

Questo risultato appare molto meno certo nel caso delle vacche, per le quali la percentuale è limitata al 50% dei casi (Schmidely e Sauvant, 2001). D'altra parte, anche gli stessi Chilliard e Bouchier (1993) hanno evidenziato che, fra i ruminanti, la pecora risponde all'integrazione lipidica della dieta con aumenti del tenore di grasso del latte più elevati di quanto riscontrato nella capra e nella vacca. In alcuni casi, tuttavia, si è assistito, in conseguenza all'impiego di diete ad alto contenuto lipidico totale e di PUFA, a diminuzioni consistenti della quantità di grasso prodotta e/o alla diminuzione dell'ingestione di sostanza secca (-1.3% di grasso nel latte) (Zervas et al., 1998).

E' interessante sottolineare che gli effetti positivi o negativi ascrivibili all'inclusione di grassi non protetti nella dieta, sembrano essere funzione non solo della quantità totale di lipidi apportata, ma anche della natura e dello stato fisico della fonte lipidica impiegata. In effetti, è stato sottolineato da diversi studi di settore che, ad esempio, l'impiego di olio di soia nella dieta in quantità tali da avere un estratto etereo della razione pari al 5.7%, ha comportato una depressione significativa della produzione di grasso nel latte; mentre, l'utilizzo semi interi di girasole o cotone, in quantità tali da raggiungere un estratto etereo pari a circa il 7%, ha indotto un aumento del grasso nel latte (Zervas et al., 1998; Osuna et al., 1998). In questo caso, sembra di poter supporre che il tegumento dei semi abbia esercitato una certa protezione nei confronti dell'olio in essi contenuto. Nel caso dell'insilato di polpe di oliva, tuttavia, pur non essendo presente alcun tipo di protezione, si è verificato un aumento dell'ingestione di sostanza secca ed un

incremento dei lipidi totali del latte, con estratto etereo della razione pari al 3.3 % (Hadjipanayiotou, 1999).

Da queste prime indicazioni, pertanto, sembrerebbe che anche nella pecora da latte, così come ipotizzato per la specie bovina (Bauman e Griinari, 2001), la presenza nella dieta di elevate quantità di oli ricchi in acidi grassi polinsaturi sia condizione favorevole all'instaurarsi di particolari condizioni ruminali che conducono alla formazione di alcuni acidi grassi responsabili della depressione della sintesi lipidica mammaria. Le informazioni in nostro possesso, tuttavia, rimangono troppo esigue per poter arrivare a qualsiasi tipo di conclusione in merito.

### **4.3 Impiego di fonti lipidiche rumino-protette nell'alimentazione delle pecore**

Come accennato precedentemente, tra le varie tecnologie per presiedere alla protezione ruminale dei lipidi quella dei saponi di calcio rappresenta sicuramente la forma più utilizzata anche per le pecore da latte.

La bibliografia specifica riporta che l'inclusione dei saponi di calcio dell'olio di palma nella dieta degli ovini da latte ha evidenziato, in termini di contenuto lipidico totale, un incremento medio pari a +13% (Schmidely e Sauvant, 2001), contrariamente a quanto avviene per le vacche da latte nelle quali gli effetti sono registrati sono stati notevolmente meno evidenti (Chilliard et al., 1993).

La produzione quantitativa di latte sembra essere poco influenzata dall'apporto di saponi di calcio (circa il 2% in più) e, solo per dosi superiori a 100 g al giorno, sembrano manifestarsi effetti sfavorevoli (Schmidely e Sauvant, 2001).

Bocquier e Caja (2001), in una recente rassegna bibliografica, hanno individuato in 120g/d e 70 g/d le dosi ottimali di sali di calcio nella dieta di



pecore, rispettivamente durante l'allattamento dell'agnello e nel corso della lattazione, al fine di massimizzare il contenuto lipidico totale del latte ottenuto.

Lo stadio fisiologico delle pecore cui viene somministrata la dieta grassata, sembra essere uno dei principali fattori di variazione in gioco. In effetti, è stato osservato da alcuni studi, che le maggiori risposte in termini di modificazione quali-quantitativa della produzione di latte si sono fatte registrare durante la fase iniziale della lattazione (Perez-Alba et al, 1997, Casals et al., 1999), rispetto alle performance relative all'intera durata della lattazione stessa (Rotunno et al., 1998). Schmidely e Sauvant (2001) hanno ipotizzato che questo tipo di risposta potrebbe dipendere dal bilancio energetico negativo della pecora che regola l'efficacia di utilizzazione dei lipidi alimentari attraverso la modulazione delle lipoproteine lipasi nella ghiandola mammaria e nel tessuto adiposo, determinando una miglior efficacia di trasferimento degli acidi grassi ematici verso la mammella ad inizio della lattazione, mentre, viceversa, in quelle successive verso i tessuti adiposi di riserva.

L'eventuale effetto depressivo esercitato dai lipidi della dieta sul tenore proteico del latte aumenta con l'avanzare della lattazione, così come quello esercitato sul contenuto totale in caseine. Tale fenomeno comporta, però, una riduzione della concentrazione totale della componente proteica del latte, ma non altera i rapporti esistenti tra le diverse frazioni presenti, anche relativamente allo specifico delle caseine (Bocquier e Caja, 2001).

Come è già stato sottolineato, la quasi totalità delle sperimentazioni considerate per la stima delle dosi ottimali di saponi di calcio nella dieta delle pecore in lattazione è basata sull'utilizzo dei sali di calcio olio di palma, in funzione del fatto che questa rappresenta sicuramente la fonte lipidica più studiata per la grassatura delle razioni.

Ciò nonostante, data la vocazionalità degli ambienti mediterranei all'allevamento estensivo degli ovini da latte, la ricerca di settore ha concentrato parte della propria attenzione nel verificare l'opportunità di impiego dei saponi di calcio dell'olio d'oliva, che, come è noto, entro questo areale rappresentano un vero e proprio sottoprodotto dell'industria molitoria. I risultati desunti dalle

sperimentazioni condotte hanno permesso di evidenziare che gli effetti dell'inclusione di tali saponi di calcio (in quantità tale da avere un contenuto di estratto etereo nella dieta compreso tra 5 e 7%) inducono effetti del tutto simili a quelli brevemente accennati, trattando dell'olio di palma. Ciò a dire, che mediamente si assiste ad un aumento della produzione del grasso del latte (dal + 5 al +8%), a fronte di una produzione quantitativa invariata o leggermente superiore a quella ottenuta da soggetti alimentati con diete testimoni.

#### **4.4 Tipologia di fonti lipidiche impiegabili per la grassatura delle razioni degli ovini da latte e ripercussioni in termini di modificazione della componente lipidica.**

Come evidenziato in seno alla trattazione precedente agire sulla quali-quantità del grasso contenuto nel latte ovino è possibile in modo efficiente, efficace e duraturo attraverso la formulazione di diete opportunamente arricchite in lipidi. D'altronde, è noto che il tipo di modificazione ottenuto a mezzo della razione è funzione dello stadio fisiologico degli animali, dell'entità della grassatura, dello stato fisico, ma anche e soprattutto della natura della fonte lipidica. Ciò a dire che in funzione della tipologia di fonte lipidica impiegata e delle sue caratteristiche chimico-nutrizionali peculiari, è possibile prevedere il tipo e l'entità della modificazione quali-quantitativa della frazione lipidica del latte. In questo senso, di seguito si tratta brevemente la risposta produttiva degli ovini all'impiego delle diverse strategie di arricchimento della dieta impiegata.

## 4.5 Grassatura della dieta a mezzo di granelle ed oli.

Come accennato più volte nel corso della trattazione, la natura della fonti lipidiche impiegate per la grassatura della dieta è in grado di modificare la quali-quantità della matrice lipidica del latte, ossia di variarne sia il contenuto medio, espresso in termini di lipidi totali, che la composizione acidica. Ciò nonostante per procedere ad una grassatura razionale che consenta di ottenere i risultati attesi in termini di quali-quantità del grasso del latte e di buon funzionamento del metabolismo complessivo dei nutrienti apportati con la dieta, è necessario valutare sia le quantità di lipidi da apportare, sia la forma fisica con cui farlo. Ad esempio, alimenti contenenti elevate quantità di PUFA a lunga catena aumentano la traslocazione di tale classe di FA al latte, ma, se esse non sono adeguatamente protette, comportano anche un notevole aumento delle forme *trans* mono e poli insature come conseguenza diretta delle bioidrogenazioni ruminali. Nella vacca da latte, inoltre, è stato osservato che la concomitanza di turbamenti dei processi ruminali ed inclusione di PUFA nella dieta, porta ad un sensibile calo della quantità di grasso totale del latte (Bauman e Griinari, 2001), questo fenomeno, tuttavia, non è ancora stato dimostrato nella pecora.

Kitessa et al. (2001) hanno appurato che l'impiego di oli di pesce, protetti e non, provoca interferenze con il metabolismo ruminale riducendo l'ingestione di sostanza secca e favorendo l'accumulo nel prestomaco di acidi grassi *trans* C18:1. In particolare, questi autori hanno evidenziato che nella pecora i processi di bioidrogenazione ruminale a carico della fonte lipidica non protetta inducono alla formazione di specifici derivati dei C18:1, come l'acido 10-idrossi-stereato, che si accumulano nel plasma anche sottoforma di NEFA, andando, quindi, ad insistere sulla funzionalità epatica che li catabolizza a mezzo della  $\beta$ -ossidazione. Inoltre, lo stesso studio ha dimostrato che la grassatura della dieta con olio di tonno

rumino-protetto ha comportato un notevole incremento nella concentrazione di EPA, mentre quella di DHA rinvenuta nel latte è rimasta pressoché invariata.

L'aggiunta di saponi di calcio, di norma, comporta un aumento della frazione insatura a lunga catena ed una diminuzione di quella satura. I sali di calcio dell'olio di palma, a causa del loro elevato contenuto in acido palmitico (C16:0), comportano ovviamente anche un aumento del livello di questo stesso FA nel latte (Rotunno et al., 1998; Todaro et al., 1997; Pulina et al., 1990). In particolar modo, l'inclusione nella dieta di pecore da latte di saponi di calcio di acidi grassi insaturi, come quelli dell'olio di oliva, ha fatto registrare un aumento del contenuto totale di acido octadecenoico nel latte (Perez-Alba et al., 1997; Antongiovanni et al., 2002). Tuttavia, non è ancora chiaro se tale aumento sia ascrivibile ad un maggior contenuto di acido oleico (C18:1 *cis* 9) oppure, come evidenziato nelle bovine da latte (Secchiari et al., 2001 a), all'aumento di altri isomeri posizionali e geometrici. I risultati di un recente lavoro sui processi di bioidrogenazione ruminale a carico dell'acido oleico sembrerebbero confermare questa ipotesi (Mosley et al., 2002).

## **4.6 Arricchimento lipidico della dieta degli ovini da latte a mezzo del pascolo.**

L'arricchimento della dieta ovina in FA a mezzo del pascolo naturale è la tecnica sicuramente più impiegata, se pur con livelli di consapevolezza diversi, dagli ovinicoltori del bacino del mediterraneo, in funzione del carattere estensivo che tale tipologia d'allevamento ha tradizionalmente avuto. Ovviamente, l'arricchimento lipidico della razione a mezzo della biomassa vegetale spontanea comporta un carattere di maggiore aleatorietà rispetto all'aggiunta alla razione di quantità dosate di granella. Ciò a dire che la risposta produttiva degli ovini in termini quali-quantitativi è funzione della tipologia del cotico offerto, dello stadio

vegetativo dello stesso, della latitudine ed altitudine dei pascoli e del decorso stagionale che così pesantemente insiste sulla curva di offerta della biomassa e sulla sua qualità chimico-nutrizionale e della quantità di biomassa effettivamente ingerita dagli animali al pascolo. In questo senso sono da valutarsi gli studi di settore che hanno cercato di individuare valori medi di riferimento dei diversi cotici rinvenibili alle nostre latitudini. Ciò evidentemente, costituisce uno strumento di valutazione e predizione della modificazione qualitativa della frazione lipidica del latte degli animali al pascolo.

Il pascolo naturale rinvenibile nelle regioni temperate, mediamente, contiene circa l'1-3% di FA, tale concentrazione, però, risente del decorso stagionale ed è, quindi, massima durante i picchi di offerta della biomassa vegetale che corrispondono, generalmente, con le stagioni primaverile ed autunnale. La caratteristica peculiare delle essenze foraggere presenti alle nostre latitudini è data dal fatto che più della metà degli FA presenti è rappresentato dall'ALA (55-65%), mentre nelle specie foraggere tropicali la concentrazione media di l'ALA scende al 15-40%. Resta di fatto che la frazione acidica di un pascolo polifita è fortemente influenzata dalla specie botanica d'appartenenza delle diverse essenze, dalla loro percentuale relativa, dal decorso stagionale, dal grado e dalla tipologia di utilizzo del cotico (Dewhurst et al., 2001).

Detto ciò, appare evidente che anche il foraggio ed, in particolar modo, quello fresco può essere opportunamente impiegato per modificare in modo efficiente, efficace e duraturo la quali-quantità della matrice lipidica del latte. Di seguito (Tabella 5.1), è evidenziata la differenza a livello di profilo acidico del latte di animali che abbiano disposto di solo pascolo, di pascolo e concentrati e di soli concentrati.

Come accennato brevemente, uno dei fattori di variazione maggiormente chiamati in causa nella definizione del profilo acidico dei prodotti lattiero-caseari arricchiti a mezzo del pascolo, è proprio la natura stessa del pascolo impiegato. In effetti, alcuni studi di settore hanno concentrato la propria attenzione proprio sulla messa a fuoco delle differenze mediamente esistenti tra i cotici spontanei rinvenibili a diverse latitudini ed altitudini, in funzione proprio del loro contributo

sulla qualità del latte. In questo senso, è stato verificato che il pascolo di montagna sembrerebbe essere più ricco in BA (C4:0) e ciò potrebbe spiegare le caratteristiche organolettiche specifiche dei prodotti d'alpeggio caratterizzati da una maggiore spalmabilità e da un bouquet aromatico tipico. Inoltre, il pascolo d'alpeggio sembra poter influire positivamente anche sulla concentrazione in acido laurico (C 12:0), uno degli FA maggiormente inquisiti per le CHD (Tabella 4.1).

Tabella 4.1 – Composizione acidica media del latte ottenuto somministrando fonti foraggere e diete diverse(g/kg di grasso)

Tipo di Foraggio	Pascolo di pianura	Pascolo di montagna	Insilato di erba	Insilato di mais
% nella razione	100	100	63	68
C4:0	35	48	32	34
C6:0 + C8:0	32	31	32	41
C10:0 + C12:0	58	45	73	82
C14:0	99	96	125	124
C16:0	258	249	356	327
C16:1	17	18	16	22
C18:0	114	108	99	81
C18:1 t10+t11	21.1	36.6		7.3
C18:1	279	283	209	195
CLA	8.7	16.1	5.3	4.7
C18:2	26	45	15	22
C18:3	14	15	5	3

(adattata da: Kelly et al., 1998; Chilliard et al., 2001; Collomb et al., 2001; Onetti et al., 2001)

Viceversa, relativamente alla concentrazione media dell'acido miristico (C14:0), i dati disponibili non sembrano indicare differenze significative correlabili all'impiego di cotici naturali montani o di pianura (Ulbricht et al., 1991). In ogni caso, per quel che concerne i MCFA, ossia gli SFA maggiormente implicati nelle CHD, è stato evidenziato che il ricorso all'impiego di foraggi freschi influenza positivamente la qualità del profilo acidico, rispetto a quello ottenuto da animali alimentati esclusivamente con concentrati.

Per quel che concerne la concentrazione di SA (C 18:0) è da vedersi come vox media, in funzione della sua parziale conversione in C 18:1 e della

evidenziata relativa innocuità rispetto all'induzione delle CHD. Relativamente al MUFA OA (C 18:1), l'integrazione della dieta con foraggi freschi e conservati è sicuramente uno dei fattori che agisce positivamente.

Per quanto riguarda la concentrazione degli acidi linoleico (C18:2) e linolenico (C18:3), è evidente che un'alimentazione basata sull'assunzione di foraggi freschi influisca più che positivamente sul loro ricovero al livello di pattern acidico (Tabella 6.2). Tale aspetto si riflette positivamente sulla salute del consumatore in funzione del fatto che tali acidi sono i precursori dei CLA e dei PUFA a lunga catena della serie n-3. In ogni caso, indipendentemente dal contenuto medio di PUFA C18:2 e C18:3 delle diverse fonti foraggere, il loro trasferimento al latte e alla carne dei ruminanti è sempre abbastanza esiguo (circa l'1-4%, contro il 28% dell'oleico, l'11% dello stearico e il 25% del palmitico), a dimostrazione dell'intensa attività ruminale di saturazione per idrogenazione degli FA insaturi.

È noto che il miglior contributo intermini di modificazione, per così dire positiva della frazione acidica del grasso, è giocato dai foraggi verdi, rispetto a quelli conservati siano essi essiccati o insilati. Ciò sembra essere dovuto ad una parziale ossidazione degli acidi grassi presenti nei foraggi durante i processi di conservazione e/o insilamento e, quindi, ad una minore disponibilità complessiva di FA, oltre che ad una minore qualità degli stessi (Chilliard et al., 2001). L'insilato di mais è comunque un foraggio particolare e diverso dagli insilati di altre essenze, soprattutto perché risulta più ricco di linoleico. Ciò è dovuto al fatto che la granella, presente normalmente intorno al 30-40% nell'insilato, contiene già di per sé circa il 60% di questo acido. Quando il silomais supera il 60% della sostanza secca della dieta, i dati sperimentali riportati in letteratura dimostrano che sono favoriti gli acidi grassi da C6 a C12 ed il linoleico a spese dello stearico e del linolenico. Inoltre, il latte di animali alimentati con circa il 60% di silomais contengono solo in tracce VA e CLA, rispetto al grasso del latte di animali nelle cui diete siano contenute importanti quantità di foraggi freschi. Per quanto attiene alla fienagione come tecnica di conservazione, invece, la letteratura riporta che l'uso dei fieni deprime la concentrazione degli acidi grassi a lunga catena in

generale e del linolenico in particolare, con conseguente compromissione della quantità di n-3 nel latte prodotto.

Concludendo, sembra evidente che sistemi estensivi di produzione e gestione del gregge, che consentano il ricorso razionale al pascolo possono garantire una modificazione, per così dire, salutistica della frazione lipidica del grasso del latte dei ruminanti. Tale aspetto, inoltre, sembra potersi porre come valido elemento per la promozione dei prodotti lattiero-caseari ovini, che stagionalmente, sono differenziabili in funzione di un maggiore/minore contenuto in FA ad alto portato biofunzionale. In ultimo, anche se non è questa la sede deputata, sembra importante accennare brevemente al fatto che il ricorso al pascolo influisce positivamente anche sul profilo aromatico dei prodotti lattiero-caseari, imprimendo agli stessi un bouquet specifico. In questo senso, la ricerca di settore si è interessata ed ad oggi ancora lo è, ad individuare un composto aromatico, anche di natura liposolubile, che possa delinearsi come markers del prodotto lattiero-caseario ottenuto da animali al pascolo e su determinate tipologie di cotici.

## **4.7 Effetti dell'integrazione con semi di lino sul profilo acidico del latte di pecora**

Numerosi studi condotti prevalentemente sulla specie bovina, hanno permesso di evidenziare il tipo di modificazione acidica cui si assiste integrando la dieta dei ruminanti con olio o semi di lino sottoposti a diverso tipo di trattamento termico e/o meccanico. La grassatura della dieta con tale tipologia di fonte lipidica consente di ottenere un arricchimento naturale del latte e della carne dei ruminanti in acidi grassi polinsaturi a lunga catena delle serie n-3 ed n-6 ed in particolare in ALA.

Tale categoria di PUFA non è sintetizzata dai tessuti dei ruminanti e, quindi, la loro concentrazione nel latte e nella carne è funzione della quantità



apportata a mezzo della dieta. Come è evidenziato precedentemente i PUFA ed, in particolare quelli della serie n-3, svolgono alcune azioni importanti sulla salute dell'uomo e si pongono come fattori di prevenzione relativamente all'insorgenza delle CHD. A tali acidi grassi, infatti, sono attribuite le seguenti attività: i) sono coinvolti nei meccanismi di regolazione delle strutture cellulari di tutte le cellule dell'organismo ed in particolar modo di quelle del cervello, della retina e dell'apparato riproduttivo; ii) attraverso reazioni catalizzate dagli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi generano sostanze ad azione ormone-simile come i trombossani, i leucotrieni e le prostaglandine.

Le quantità di PUFA sintetizzate dall'uomo non sono sufficienti ad assicurare gli apporti giornalmente necessari di tali acidi grassi che, quindi, pur non rivestendo di fatto lo status di acidi grassi essenziali, devono essere necessariamente integrati a mezzo della dieta. Ciò spiega l'interesse di certa parte della ricerca di settore nel definire le strategie alimentari più idonee ad implementarne la presenza nei prodotti dei ruminanti, nonostante il ruolo giocato dal PUFA n-6 più rappresentato, ossia l'acido arachidonico (AA), sia ancora controverso.

In questo senso, è stato verificato che il modo più efficiente ed efficace di procedere all'arricchimento dei prodotti dei ruminanti a mezzo della dieta è procedere alla grassatura della razione con semi di lino, che contengono circa il 50% di ALA rispetto al contenuto totale in FA. (Chilliard et al., 2007). In effetti, è stato dimostrato da diversi studi che procedendo all'integrazione degli animali con semi di lino estrusi si può arrivare ad un'implementazione del contenuto in ALA nel latte fino ad un + 20% (Chilliard et., 2000).

Tuttavia l'impiego di lino per la grassatura della dieta degli ovini e, più in generale, dei ruminanti deve tenere in considerazione alcuni aspetti importanti legati a: i) ruolo negativo giocato dall'apporto di lipidi, oltre certe soglie, sulla digeribilità della fibra; ii) larga riduzione delle popolazioni di protozoi presenti a livello ruminale; iii) modificazione delle fermentazioni ruminali con conseguente maggiore produzione del VFA acido propionico. Ciò, evidentemente potrebbe comportare un detrimento delle performance produttive legato alla cattiva

utilizzo dei nutrienti della dieta, con conseguente bilancio energetico negativo. D'altro canto, il ruolo negativo giocato dalla grassatura a base di lino è ancora controverso, in quanto sembra essere fortemente correlato alla dose di lipidi somministrata e allo stato fisico della fonte lipidica stessa. In effetti, tali aspetti negativi correlati all'uso del lino, verificati sulle pecore da latte, non sono stati riscontrati su bovine lattifere per le quali non è stata riscontrata né una riduzione dell'energia utilizzata, né una modificazione della produttività (Chilliard et al., 2007).

Ciò a dire, che dati gli importanti risultati ottenibili a mezzo dell'impiego del lino come fonte lipidica per la grassatura della dieta, sembra opportuno approfondire ulteriormente lo stato dell'arte relativo alle dosi sopportate dalle diverse specie e l'eventuale sinergia/antagonismo esistente tra lo stesso lino e gli altri componenti della razione. In ultimo, è bene sottolineare che la somministrazione di lino nelle diverse forme comporta un sostanziale arricchimento del latte e della carne in termini di ALA, a cui fa seguito un incremento di entità minore delle quantità medie di EPA e DHA, di cui l'ALA è precursore.

L'arricchimento naturale del latte e della carne con PUFA, inoltre, deve tenere di conto due problematiche specifiche correlate da un lato dalla bassa efficienza di trasferimento di tali FA dalla dieta ai prodotti e dall'altro alla spinta attività di insaturazione messa in atto dalle popolazioni ruminali a loro carico. In effetti, numerosi studi condotti nel corso del tempo sulle 3 specie ruminanti prevalenti (bovini, ovini, caprini) ha consentito di verificare che la somministrazione di olio di lino non ruminato protetto comporta una sostanziale bioidrogenazione dell'ALA, con scarsi risultati in termini di arricchimento dei prodotti. In effetti, studi che hanno confrontato diete integrate con lino sottoforma differente hanno consentito di verificare che il lino in seme risulta essere più efficiente, in funzione della protezione estrinseca del tegumento a carico dell'olio in esso contenuto, rispetto a quanto verificato relativamente a diete grassate con olio libero (Chilliard et al., 2000).

Per quel che concerne, invece, l'efficienza di trasferimento degli n-3, EPA, DHA e C 22:5, è stato verificato che risulta essere soddisfacente solo attraverso infusione duodenale di una miscela di tali acidi grassi. Diversamente, invece, è stato verificato che l'efficienza di trasferimento dal sangue al latte per EPA, DHA e C 20:5 è rispettivamente del 2, 14 e 22%. Ciò sembra poter essere spiegato a mezzo degli studi che hanno verificato la forte azione di bioidrogenazione estrinsecata dalle popolazioni ruminali a carico dell'EPA, più ancora che degli altri 2 n-3. Inoltre, si ritiene che parte dell'EPA possa essere elongato e, quindi, convertito in C 20:5. Nel processo di trasferimento di tali acidi grassi al latte gioca un ruolo importante sia la maggiore capacità di inclusione ad opera del tessuto mammario del C 20:5 rispetto agli altri n-3 ed il fatto che l'EPA ed il DHA sono prevalentemente concentrati negli esteri del colesterolo e all'interno della frazione lipidica e, quindi, disponibili solo in parte per la neo sintesi lipidica operata dalla ghiandola mammaria (Chilliard et al., 2007) .

In definitiva, il ricorso al lino consente di ottenere un sostanziale arricchimento del latte dei ruminanti in termini di PUFA ed in particolar modo di ALA, con indubbi risvolti positivi per la salute del consumatore. Ciò nonostante, in ragione delle problematiche accennate brevemente, sembra evidente la necessità di approfondire lo stato attuale delle conoscenze relative alle modalità di impiego dei semi di lino al fine di ottenere gli effetti desiderati in termini di modificazione acidica del latte.

## **4.8 Effetti dell'alimentazione sul contenuto di CLA nel latte**

Come illustrato in precedenza, l'andamento del processo di bioidrogenazione ruminale svolge un ruolo fondamentale nel determinare la quantità di VA e di una quota variabile di isomeri CLA che esce dal rumine e,

attraverso la via dell'assorbimento intestinale, raggiunge i tessuti, per essere incorporata nel grasso.

Numerosi studi hanno evidenziato che il regime alimentare è il fattore che più di altri concorre ad influenzare l'andamento delle bioidrogenazioni ruminanti. In particolare la presenza di fonti lipidiche nella dieta ricche in LA e ALA, il diverso rapporto foraggi/concentrati della dieta, l'equilibrio fra proteine e carboidrati della dieta e la natura della componente foraggera della razione sono i fattori il cui effetto è stato maggiormente studiato nelle diverse specie di ruminanti, anche se, indubbiamente, la quantità di dati disponibili per la specie bovina è decisamente superiore a quella presente per le altre specie (Figura 4.1).

Allo stato attuale delle conoscenze è possibile affermare che i maggiori incrementi di CLA nel latte si sono ottenuti mediante l'utilizzo di fonti lipidiche nella dieta come gli oli vegetali ad alto contenuto di LA e di ALA (olio di girasole, olio di soia, olio di lino, olio di cartamo) e l'olio di pesce. Buoni risultati, anche se certamente inferiori a quelli riportati per gli oli sopra ricordati, sono stati ottenuti anche con oli ad elevato contenuto OA, come l'olio di colza e l'olio di oliva. Gli incrementi più significativi si ottengono allorché l'integrazione di lipidi della dieta supera il 4% della sostanza secca totale ingerita dall'animale.

Anche i semi interi delle stesse specie vegetali sopra ricordati consentono di ottenere significativi incrementi del contenuto di CLA nel latte e nella carne, anche se, a parità di specie vegetale, il valore di tali incrementi è inferiore a quello ottenibile con l'uso del solo olio. I semi oleosi sottoposti a trattamenti come l'estrusione consentono di ottenere risultati intermedi tra quelli riscontrabili con l'uso del seme non trattato e l'olio puro.

Figura 4.1 -Effetto dell'integrazione lipidica della dieta sul contenuto in CLA del latte ovino

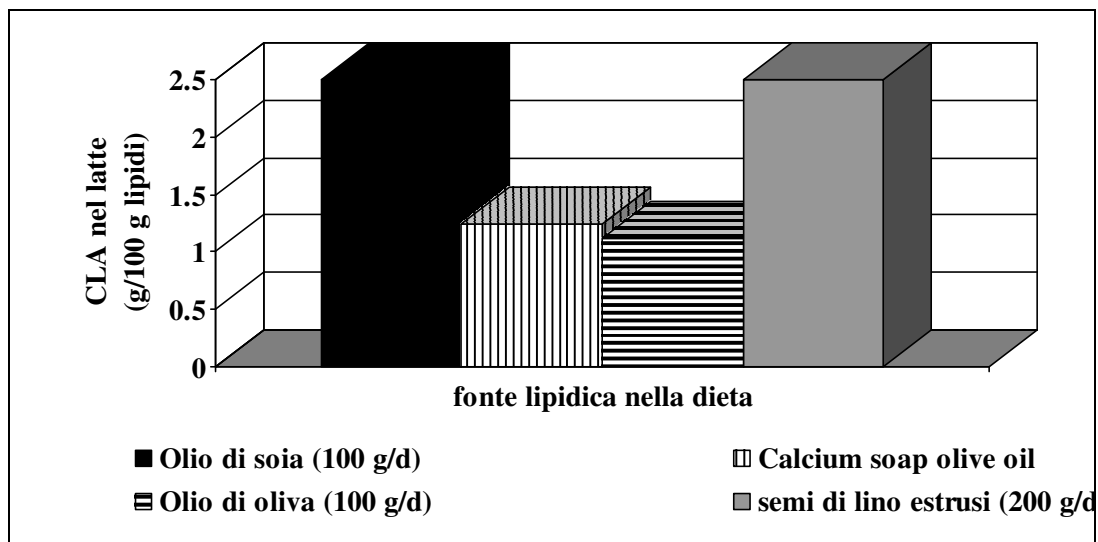
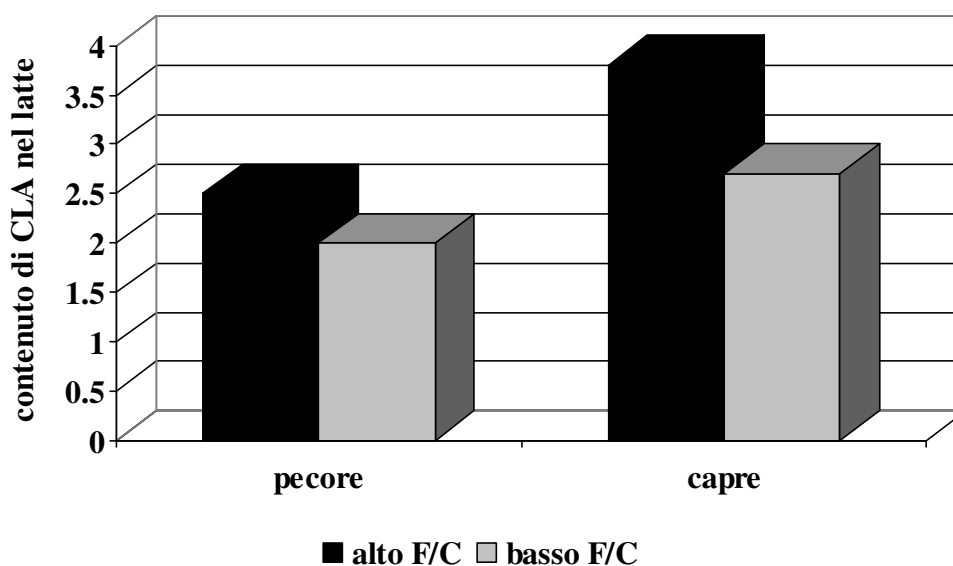


Figura 4.2 - Effetto dell'integrazione con olio di soia (100 g/capo/giorno) in pecore e capre in lattazione, al variare del rapporto foraggio/concentrato (F/C)



E' importante ricordare che, in riferimento all'utilizzo di oli ad alto contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFA), i risultati riportati in letteratura, a parità di quantità di olio somministrato con la dieta, variano in funzione della

specie utilizzata, dell'attitudine produttiva (latte o carne) e anche delle interazione con le altre componenti della dieta. Un ruolo particolare, a questo proposito, sembra essere svolto sia dalle caratteristiche della base foraggera della dieta (erba fresca, fieno, insilato) sia dal rapporto foraggio/concentrato (figura 4.2, Mele et al., 2006).

Questi fattori sembrano essere importanti soprattutto nel determinare i diversi rapporti che si instaurano fra gli isomeri CLA e gli isomeri *trans* del C18:1. Diete a più alto contenuto di concentrato o nelle quali la base foraggera è costituita da insilati, sembrano favorire l'accumulo di più elevate quantità di *trans*-10 C18:1 e *trans*-10, *cis*-12 CLA a spese del contenuto di VA e di RA. Nella bovina da latte l'aumento della produzione ruminale dei primi due acidi grassi è stato messo in relazione alla comparsa della sindrome della depressione del grasso nel latte, a causa di un loro effetto inibitorio sugli enzimi lipogenici mammari.

La presenza di erba fresca nella razione degli animali garantisce, di norma, un sufficiente apporto di ALA, tale da garantire contenuti di VA e di RA nel latte e nella carne in alcuni casi comparabili con quelli ottenibili con l'aggiunta di oli ad alto contenuto di PUFA. In questo caso, tuttavia, un ruolo molto importante è svolto anche dalla modalità di assunzione dell'erba stessa, dalla composizione floristica del cotico erboso e dallo stadio di maturazione delle stesse essenze foraggere. In generale, l'erba fresca assunta tramite pascolamento consente di massimizzare l'apporto di ALA al rumine rispetto al caso in cui si somministri sfalciata, in quanto si evitano le perdite dovute all'ossidazione di ALA ad opera delle lipossigenasi della pianta.

Diversi studi hanno evidenziato che il contenuto di CLA nel latte, a parità di erba ingerita, è funzione anche della composizione floristica del cotico erboso. In particolare la presenza di trifogli è spesso associata a più elevati contenuti di CLA rispetto a pascoli di sole graminacee o con essenze appartenenti ad altre famiglie botaniche.

Infine, la presenza contemporanea nella dieta degli animali di oli ricchi in PUFA e di erba fresca non sempre ha manifestato un effetto sinergico e, quando

tale effetto è stato osservato, il contenuto totale di grasso del latte ha subito una significativa riduzione. I motivi che stanno alla base di questo fenomeno, tuttavia, non sono ancora stati chiariti, anche se, probabilmente, il grado di insaturazione dei lipidi aggiunti alla dieta, insieme alla qualità e alla quantità di erba ingerita, giocano un ruolo importante nel determinare gli effetti sopra osservati.

In definitiva, allo stato attuale delle conoscenze è possibile affermare che esistono sufficienti evidenze sperimentali per applicare con successo specifiche strategie di arricchimento del latte, relativamente al contenuto di CLA, in funzione del livello che si vuole ottenere. Esistono, tuttavia, ancora alcuni ambiti da approfondire in merito alla possibilità di ottenere livelli di arricchimento costanti durante l'intera lattazione nelle specie lattifere più importanti.

Un altro aspetto che merita di essere approfondito è quello relativo al fatto che le strategie di arricchimento sopra ricordate comportano, come effetto associato all'aumento del RA nel latte, anche un aumento del VA e di altri isomeri *trans* del C18:1 e di isomeri non coniugati del C18:2 e C18:3. Nonostante l'isomero *trans* predominante rimanga il VA che, come è già stato sottolineato, rappresenta anche nei tessuti umani un precursore del RA ed è, pertanto, da considerarsi in maniera differente rispetto agli altri isomeri *trans* C18:1. In ogni caso, riferendoci all'intero pool dei *trans* FA, alla stregua di quanto previsto per l'eventuale indicazione in etichetta del loro contenuto medio, l'incremento di CLA nel latte è sempre accompagnato da incrementi significativi degli isomeri *trans* del C18:1. Questo fatto va attentamente valutato e considerato ai fini della valorizzazione dei prodotti e di una loro eventuale immissione sul mercato.

Infine, è necessario tenere in considerazione che, a parità di strategia nutrizionale, i risultati ottenibili nelle diverse specie e razze di animali lattiferi non sempre sono omogenei, in quanto esistono specifici effetti individuali, di razza e di specie, spiegabili, almeno in parte, anche con una variabilità genetica associata al contenuto di CLA nel latte e nella carne. Questo aspetto, quindi, non consente di poter escludere anche possibili effetti di interazione fra strategie nutrizionali e tipi genetici.

## 5 SCOPO DEL LAVORO

Lo scopo del lavoro di ricerca svolto è quello di mettere a punto una tecnica di razionamento che, partendo dall'inclusione di una fonte lipidica nella dieta di pecore in lattazione, consenta un miglioramento efficiente, efficace e prolungato della frazione lipidica del latte. Ciò al fine di ottenere una materia prima naturalmente arricchita in FA con proprietà biofunzionali e, quindi, fornire al consumatore un alimento maggiormente conforme alle proprie esigenze nutrizionali ed in grado di porsi come fattore di prevenzione delle CHD e, più in generale, della sindrome metabolica. In questo senso, si è operato includendo nella razione giornaliera di pecore di razza Sarda a lattazione stabilizzata una quantità di lino estruso tale da garantire l'arricchimento naturale del latte sia in CLA sia in ALA.

Al fine di testare la spendibilità su ampia scala del management alimentare proposto, si è valutato anche il coefficiente di trasferimento di tali FA dal latte ai prodotti lattiero-caseari derivati e lo stato di ossidazione degli stessi. In effetti, è noto che i PUFA sono, per loro stessa struttura stereochimica, particolarmente soggetti all'ossidazione e potrebbero, quindi, inficiare la conservabilità dei prodotti arricchiti e comprometterne lo stato di salubrità. Inoltre, sempre nell'ottica di rendere esportabili i risultati ottenuti in seno alla sperimentazione, si è verificata la persistenza dell'arricchimento in FA traslocati dalla dieta al latte, al fine di fornire agli allevatori una tecnica di razionamento che consenta nel medio-lungo periodo di ottenere una materia prima arricchita da destinare, eventualmente, alla messa a punto di una gamma di prodotti al consumo biofunzionali. Infine, il formaggio prodotto nel corso della sperimentazione è stato utilizzato per una sperimentazione sull'uomo al fine di definire i reali effetti dell'assunzione di formaggi arricchiti con CLA e omega-3 sulla salute.



# Materiali e metodi

---

## 6 AZIENDA, ANIMALI E DISEGNO SPERIMENTALE

La sperimentazione è stata condotta presso un'azienda commerciale ubicata in Loc. Cura Nuova, nella Provincia di Grosseto che alleva 385 ovini da latte di razza Sarda.

L'azienda, interamente pianeggiante, si estende per circa 45 ha di cui 35 di Superficie Agricola Utilizzabile (SAU), interamente destinati alla produzione di foraggiere e granelle da reimpiegare in azienda per l'alimentazione animale. La rotazione in campo prevedeva la presenza di 31 ha di erbai di leguminose (sulla, medica e trifoglio) e 4 ha di grano. L'azienda dispone di una stalla a stabulazione libera senza paddock, ma con accesso diretto al pascolo prospicienti. Inoltre, la stalla è attigua ad un locale destinato al ricovero di attrezzature ed alimenti zootecnici.

Le pecore sono munte due volte al giorno, al mattino e alla sera, con una mungitrice meccanica a 12 poste, dotata di poste singole autocatturanti e tramoggia per la somministrazione dell'integrazione alimentare a base di concentrati.

La prova di alimentazione è stata condotta su 48 soggetti di razza Sarda, selezionate in funzione dell'epoca di parto e della produttività media, al fine di avere 2 gruppi bilanciati in termini di fase di lattazione e produzione media giornaliera di latte. Le pecore, quindi, sono state ripartite in 2 gruppi omogenei a cui sono state destinate 2 differenti interazioni alimentari, formulate in modo da poter disporre di razioni isoenergetiche ed isoproteiche (Tabella 6.1):

gruppo Controllo o C è stato alimentato con 800g/d di concentrato ricco in carboidrati non strutturali (32% sulla ss);

gruppo Lino o L con 700g/d con un concentrato contenente il 30% sulla SS di lino estruso (Omega-Lin®).

Durante le prime 6 settimane di prova, a causa delle condizioni atmosferiche avverse e delle basse temperature, la base foraggera della razione di entrambi i gruppi era costituita da fieno di graminacee, fornito ad libitum. Nell'ultimo periodo di prova, con il ristabilirsi delle condizioni meteorologiche, tutti gli animali hanno potuto utilizzare per 4 ore al giorno un pascolo polifita costituito da un miscuglio di *Avena sativa*, *Lolium italicum*, e *Trifolium repens*. La composizione chimica degli alimenti utilizzati nella prova è riportata nella tabella 6.2

Tabella 6.1- Caratteristiche chimico-nutrizionali delle 2 razioni impiegate a scopo sperimentale

	UFL/kg ss	PM (g/kg ss)	NDF (% ss)	NSC (% ss)
C	0.88	233	41.1	35.9
L	0.91	221	41.0	33.5

Unità Foraggiere Latte; UFL; Proteine Metabolizzabili, PM; Fibra Neutro Detersa, NDF; Carboidrati Non Strutturali, NSC.

Tabella 6.2 – Composizione chimico-nutrizionale degli alimenti impiegati nella prova (g/100g SS)

	SS	PG	EE	ceneri	NDF	NSC
Fieno	87.60	9.93	2.72	7.66	56.24	23.44
Concentrato C	85.31	20.71	3.41	9.10	30.91	38.28
Concentrato L	84.17	21.31	11.45	10.56	25.00	30.48

Sostanza Secca, SS; Proteine Grezze, PG; Estratto Etereo, EE; Fibra Grezza, Fibra Neutro Detersa, NDF; Carboidrati Non Strutturali, NSC.

Giornalmente è stato rilevato il consumo individuale di concentrato, mentre l'ingestione di foraggio è stata rilevata per gruppo. La prova ha avuto la durata di 10 settimane ed è stata eseguita dalla fine di gennaio alla fine di marzo 2006.

## 7 ANALISI

Da ciascun soggetto, al termine di ogni settimana di prova, è stato prelevato un campione di latte di circa 50 mL, immediatamente trasferito presso il laboratorio di Scienze Zootecniche del Dipartimento di Agronomia e Gestione dell'Agroecosistema. Qui, il campione è stato suddiviso in due aliquote:

circa 10 ml destinati all'analisi della composizione acidica è stata stoccata a -20°C in attesa di essere analizzata,

la restante parte, destinata alla determinazione delle caratteristiche tecnologiche del latte, è stata immediatamente analizzata.

Al termine della sperimentazione, il latte massale dei 2 gruppi C ed L è stato trasformato separatamente in formaggio. Il pecorino di entrambe le tesi è stato analizzato al fine di determinarne la composizione chimico centesimale ed in particolar modo il profilo acido.

Gli alimenti impiegati nel corso della prova sono stati analizzati per la determinazione della composizione chimica centesimale:

sostanza secca (SS) mediante essiccamento in stufa a 105 °C.

Sul campione essiccato sono stati inoltre determinati:

proteina grezza (PG) secondo il metodo Kjeldhal;

ceneri dopo incenerimento in muffola a 550°C, fino alla scomparsa dei residui carboniosi;

per l'estrazione dei lipidi totali, secondo Folch et al. (1951), la cui quantità è stata determinata gravimetricamente, sono stati utilizzati 5 grammi di campione fresco.

Dai campioni di latte sono stati estratti i lipidi totali con metodo Secchiari et al., (2003): 2 g di latte sono stati omogeneizzati per 1 minuto al vortex con una miscela composta da 0.4 ml di ammoniaca al 25%, 1 ml di alcol etilico, e 5 ml di esano. Dopo tale omogeneizzazione i campioni sono stati centrifugati a 3000 rpm a 2°C al fine di ottenere la separazione delle fasi. Sullo strato superiore, prelevato con una Pasteur, si è proceduto a ripetere l'estrazione per altre due volte; la prima

con una miscela composta da 1ml alcol etilico e 5 ml di esano, la seconda con 5 ml di esano.

L'estratto lipidico è stato poi portato a secco con Rotovapor a bagnomaria a 35°C, pesato per la determinazione dell'estratto lipidico totale e ridissolto nell'esano in cui era presente, come Standard Interno (SI), l'estere metilico dell'acido nonadecanoico (C19) alla concentrazione di 0.25 mg/ml.

L'estratto lipidico è stato poi *transesterificato* con metilato sodico in soluzione metanolica 0.5N secondo il metodo base catalizzato (Christie, 1982). Gli esteri metilici degli acidi grassi ottenuti come sopra riportato, sono stati quindi iniettati in un gascromatografo dotato di rilevatore ad ionizzazione di fiamma (FID) e di una colonna capillare, altamente polare, dalle seguenti caratteristiche:

lunghezza 100 m,

diametro interno 0.25 mm, spessore del film adsorbente 0.25 µm.

gas di trasporto utilizzato era l'elio.

La determinazione della composizione acidica, è stata effettuata partendo da una temperatura del forno di 120 °C; tale temperatura è mantenuta costante per 1 minuto prima di passare alla temperatura di 190 °C con un tasso di 5°C/min; questa temperatura è mantenuta costante per 10 minuti per giungere, con un tasso di 5°C, alla temperatura finale di 220°C fino all'uscita dell'ultimo acido grasso. Tale protocollo ha consentito di separare 9 isomeri *cis* e *trans* dell'acido C18:1, oltre a tutti gli altri acidi con un numero di atomi di carbonio superiore a 10.

Sul latte sono stati determinati anche gli SCFA e gli FA volatili, in accordo al metodo CHEM/0468/97 rev. 1.25 mg di estratto lipidico è stato *transesterificato* con 0.2 ml di KOH in soluzione metanolica 2N, gli esteri metilici degli FA, ottenuti come descritto, sono stati dissolti in esano contenente metilvalerato (0.4 mg/ml) come SI ed iniettati in un GC con caratteristiche tecniche ed operative analoghe a quelle utilizzato per la determinazione della composizione acidica degli acidi grassi con un numero di atomi di carbonio superiore a 10. Il calcolo delle quantità di acido butirrico è stato effettuato utilizzando una retta di regressione ottenuta con 5 fattori di risposta derivanti da altrettante soluzioni a concentrazioni variabili di metilbutirrato e metilvalerato,

dopo aver verificato che la deviazione standard dei suddetti fattori di risposta fosse inferiore al 5% di ognuno di essi. Il calcolo delle quantità degli acidi con un numero di atomi di carbonio inferiore a 11 è stato, invece, effettuato con SI (metilbutirrato) considerando 1 come fattore di risposta.

La determinazione della quantità dei diversi FA presenti con catena carboniosa costituita da meno di 10 atomi di carbonio è stata effettuata come descritto, in funzione del fatto che questi FA manifestano una volatilità tale da non poter essere quantificati con uno SI, quale il C19, le cui proprietà fisiche sono completamente dissimili.

Sul formaggio è stato determinato il contenuto di colesterolo totale secondo la metodica riportata di seguito. Dopo l'aggiunta di betulinolo come standard interno per il colesterolo, un'aliquota di LT accuratamente pesata è stata sottoposta a saponificazione a freddo utilizzando KOH in soluzione metanolica 1N. Il campione è stato mantenuto nella soluzione saponificante in agitazione per tutta la notte, all'interno di provette protette dalla luce per limitare i processi di fotossidazione. La mattina successiva il campione è stato sottoposto a 3 lavaggi successivi con acqua (per eliminare i saponi degli acidi grassi) ed etere, con il quale è stato recuperato l'insaponificabile, che è stato, infine, raccolto in pallone tarato e, dopo essere portato a secchezza con evaporatore rotante, nuovamente pesato.

L'insaponificabile, è stato silanizzato, utilizzando una miscela di piridina, esametildisilazano, trimetichlorosilano 5/2/1 vol./vol./vol.. I campioni derivatizzati sono stati iniettati in un GC equipaggiato con una colonna capillare apolare di 25 m di lunghezza di 0.25mm di diametro e di 0.25  $\mu$ m di spessore della fase stazionaria, tramite confronto del picco cromatografico del colesterolo con quello dello SI. Le determinazioni del colesterolo e dei COPs sono state effettuate in temperatura programmata.

Sul latte sono state effettuate anche le determinazioni delle caratteristiche tecnologiche. I parametri lattodinamometrici ( $r$ ,  $a_{30}$ ,  $K_{20}$ ) sono stati individuati tramite lattodinamografo Formagraph. I campioni di latte, una volta raggiunto i 35°C, sono stati posti nelle cavità cilindriche e addizionati di una determinata

quantità di soluzione di caglio. A questo punto sono stati posti nel modulo di registrazione su di un piano termostato, che è stato opportunamente rialzato al fine di consentire la penetrazione dei pendolini direttamente nel latte. Una volta in posizione, il piano comincia a muoversi alternativamente da destra a sinistra, fintanto che il latte non inizi la coagulazione, i pendolini non verranno trascinati; il loro movimento comincerà con l'inizio della coagulazione quando aumenta la resistenza meccanica al movimento del blocco. L'oscillazione che ne deriva viene registrata tramite un software e trasmessa come tracciato grafico.

La suddetta metodica permette di misurare i seguenti parametri:

Tempo di coagulazione (r): il parametro r, o durata della reazione primaria tra presame e caseina; indica il tempo necessario per l'inizio della coagulazione. Nel grafico che si ottiene dal lattodinamografo, questo parametro viene visualizzato come l'intervallo che si ha dall'inizio del processo, fino all'apertura della forcina ed è espresso in minuti primi.

Velocità di formazione del coagulo (K20): questo parametro esprime il tempo che impiega la cagliata a raggiungere una resistenza meccanica tale da produrre uno spostamento di 20mm. Nel tracciato finale è rappresentato dalla distanza che intercorre tra l'apertura della forcina di 1mm fino a 20mm. La velocità di formazione del coagulo viene espressa in minuti primi.

Consistenza del coagulo (a30): tale parametro misura l'ampiezza della forcina dopo 30 minuti dall'introduzione del caglio ed è espressa in millimetri.

Al fine di verificare lo stato di ossidazione degli acidi grassi, il formaggio è stato sottoposto a determinazione delle Sostanze Reattive all'Acido Tiobarbiturico (TBARs).

Il campione di formaggio è stato omogeneizzato in una soluzione al 5% peso/vol. di Acido TricloroAcetico (TCA) in acqua. Dopo centrifugazione a  $5.000 \times g$  per 40 min. a  $6^{\circ}\text{C}$  e successiva filtrazione del surnatante, il campione è stato fatto reagire a bagnomaria a  $93^{\circ}\text{C}$  per 20 min con una soluzione 40mM di TBA, per lo sviluppo della reazione colorimetrica. Dopo il raffreddamento il campione è stato letto allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 525 nm. La quantificazione della Malonaldeide (MDA) è stata effettuata inserendo il dato

relativo alla lettura in un'equazione di regressione ottenuta con cinque soluzioni standard di MDA ad altrettante diluizioni. Il dato è stato espresso in mg di MDA/kg di formaggio fresco.

## 7.1 Analisi statistica

I dati relativi alla composizione in acidi grassi del latte sono stati analizzati utilizzando il seguente modello lineare a misure ripetute:

$$y_{inm} = \mu + D_i + TD_n + P_m(D_i) + G_i \times TD_n + e_{inm}$$

Dove

y = variabile dipendente (acido grasso)

$\mu$  = media generale comune a tutte le osservazioni

$D_i$  = effetto fisso relativo al tipo di dieta con i che varia da 1 a 2.

$TD_n$  = effetto fisso relativo al giorno del campionamento con n compreso tra 1 e 10.

$P_m(D_i)$  = effetto casuale relativo alla pecora entro dieta, con m compreso tra 1 e 48.

$G_i \times TD_n$  = effetto dell'interazione tra dieta e giorno di campionamento.

$e_{inm}$  = errore casuale.

I parametri rilevati sul formaggio sono stati analizzati con il seguente modello lineare:

$$y_i = \mu + D_i + e_i$$

Dove

y = variabile dipendente (acido grasso)

$\mu$  = media generale comune a tutte le osservazioni

$D_i$  = effetto fisso relativo al tipo di dieta con i che varia da 1 a 2.

$e_i$  = errore casuale.

Per valutare il trasferimento degli acidi grassi dal latte al formaggio è stato utilizzato il seguente modello statistico lineare:

$$y_{ij} = \mu + D_i + M_j + D_i \times M_j + e_{ij}$$

Dove

y = variabile dipendente (acido grasso)

$\mu$  = media generale comune a tutte le osservazioni

$D_i$  = effetto fisso relativo al tipo di dieta con i che varia da 1 a 2.

$M_j$  = effetto fisso relativo al tipo di matrice alimentare, con j che varia da 1 a 2 (latte o formaggio)

$e_{ij}$  = errore casuale.



# Risultati e discussione

---

## 8 COMPOSIZIONE DEGLI ACIDI GRASSI DEL LATTE

Nella tabella 8.1a è riportata la composizione acidica del latte in funzione della dieta, la seconda parte, 8.1b, è invece riservata alle classi di acidi grassi; allo stesso modo nella prima parte della tabella 8.1.2a la composizione acidica viene analizzata in funzione della lattazione, mentre la seconda parte, 8.1.2b, è ancora dedicata alle classi di acidi grassi e ad alcuni indici che spiegano l'andamento del grado di insaturazione del latte nel corso della lattazione. Le interazioni tra i due fattori principali che hanno fatto registrare la significatività statistica, ossia dieta e lattazione, sono riportate nei grafici esposti di seguito. Dalla tabella 8.1b risulta che il latte proveniente dal gruppo che ha ricevuto l'integrazione con lino (L), rispetto a quello del gruppo di controllo (C), è molto più ricco in UFA ed in particolare in acidi grassi mono e poli-insaturi (PUFA n6 e PUFA n3). Nello specifico, è possibile evidenziare che la dieta arricchita in lino estruso ha determinato un sensibile incremento dei MUFA, che sono risultati pari a 29.57 g/100g di LT nel gruppo L ( $P < 0.01$ ), rispetto ai 23.61 g/100g del gruppo C (Tabella 8.1b). Inoltre, è possibile evidenziare che i MUFA subiscono l'effetto del fattore Test Day (TD) (tabella 8.1.2b), ciò nonostante, non è stato possibile individuare un trend ed i valori riscontrati oscillano tra un massimo di 28.50 g/100g di LT al TD2 ed uno minimo di 24.71 g/100g al TD10.

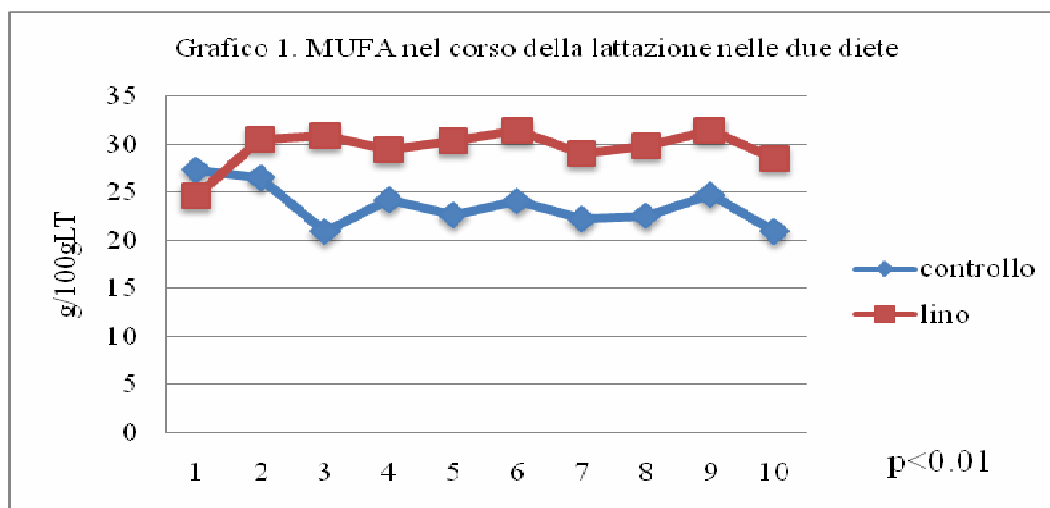
Tabella 8.1a – Composizione acidica del latte in funzione della dieta (g/100 g LT).

Acidi grassi	Gruppo C	Gruppo L	P
C4:0	4.88±0.09	4.65±0.10	0.10
C6:0	4.81±0.10	3.33±0.11	<0.01
C8:0	4.86±0.13	2.96±0.15	<0.01
C10:0	6.88±0.18	4.04±0.18	<0.01
C11:0	0.07±0.01	0.03±0.01	0.05
C12:0	3.62±0.08	2.43±0.08	<0.01
C13:0	0.06±0.01	0.05±0.01	<0.01
C14- iso	0.09±0.01	0.07±0.01	0.01
C14:0	9.85±0.12	8.08±0.12	<0.01
C14:1	0.18±0.01	0.11±0.01	<0.01
C15- iso	0.23±0.08	0.21±0.01	0.05
C15-anteiso	0.52±0.01	0.42±0.01	<0.01
C15:0	0.88±0.01	0.74±0.01	<0.01
C16-iso	0.22±0.01	0.17±0.01	<0.01
C15:1	0.09±0.06	0.01±0.06	0.31
C16:0	22.87±0.27	18.47±0.27	<0.01
C16:1 n7	0.83±0.03	0.52±0.03	<0.01
C17-anteiso	0.15±0.01	0.13±0.01	0.01
C17:0	0.50±0.01	0.44±0.01	0.01
C17:1	0.07±0.02	0.02±0.02	0.17
C18:0	8.85±0.25	10.45±0.25	<0.01
C18:1 t9	0.31±0.01	0.54±0.01	<0.01
C18:1 t10	0.50±0.04	0.72±0.04	0.01
C18:1 t11	1.72±0.24	5.87±0.24	<0.01
C18:1 t12+c7	0.47±0.01	0.82±0.01	<0.01
C18:1 t13	0.37±0.01	0.60±0.01	<0.01
C18:1 c9	17.39±0.28	17.84±0.28	0.26
C18:1 c11	0.25±0.01	0.29±0.01	<0.01
C18:1 c12	2.26±0.01	0.60±0.01	<0.01
C18:1 c13	0.15±0.01	0.22±0.01	<0.01
C18:1 c14	0.50±0.01	0.73±0.01	<0.01
C18:1 c15	0.16±0.06	0.10±0.06	0.51
C18:2 t9,t12	0.08±0.01	0.26±0.01	<0.01
C18:2 c9,c12	2.18±0.03	2.00±0.03	<0.01
C18:3 c9, c12,c15	0.87±0.04	1.89±0.04	<0.01
C20:0	0.20±0.01	0.19±0.01	0.01
C18:2 c9,t11	0.85±0.09	2.26±0.09	<0.01
C20:1	0.01±0.01	0.02±0.01	0.08
C21:0	0.06±0.01	0.07±0.01	0.09
C20 :2	0.01±0.01	0.01±0.01	<0.01
C20:4 c5,c8,c11,c14	0.10±0.01	0.06±0.01	<0.01
C22:0	0.10±0.01	0.10±0.01	0.01
C20:5 c5,c8,c11,c14,c17	0.05±0.01	0.05±0.01	0.18
C24:0	0.05±0.01	0.04±0.01	0.01
C22:5 c7,c10,c13,c16,c19	0.07±0.01	0.07±0.01	0.55
C22:6 c4,c7,c10,c13,c16,c19	0.04±0.01	0.03±0.01	0.81

Tabella 8.1b- Classi di FA ed indici del latte in funzione della diverse tesi alimentari (g/100g LT)

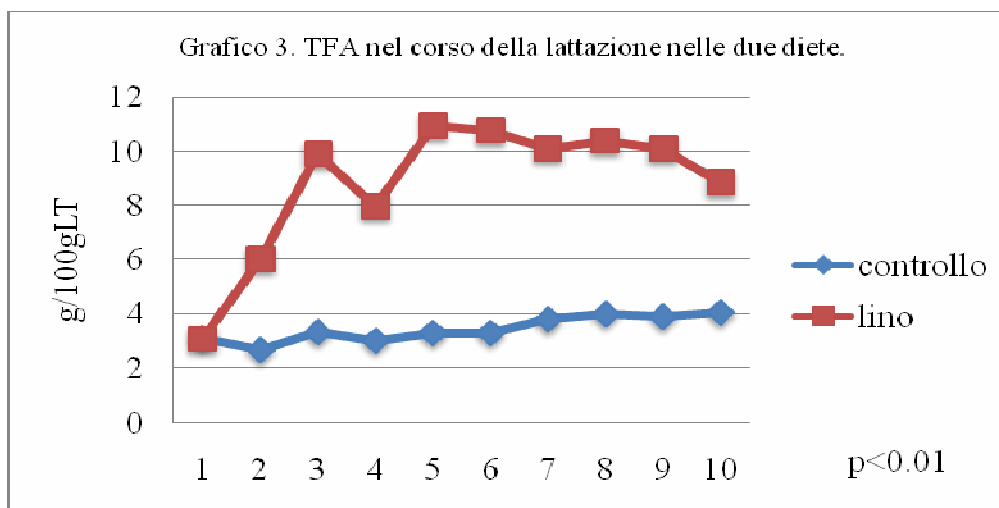
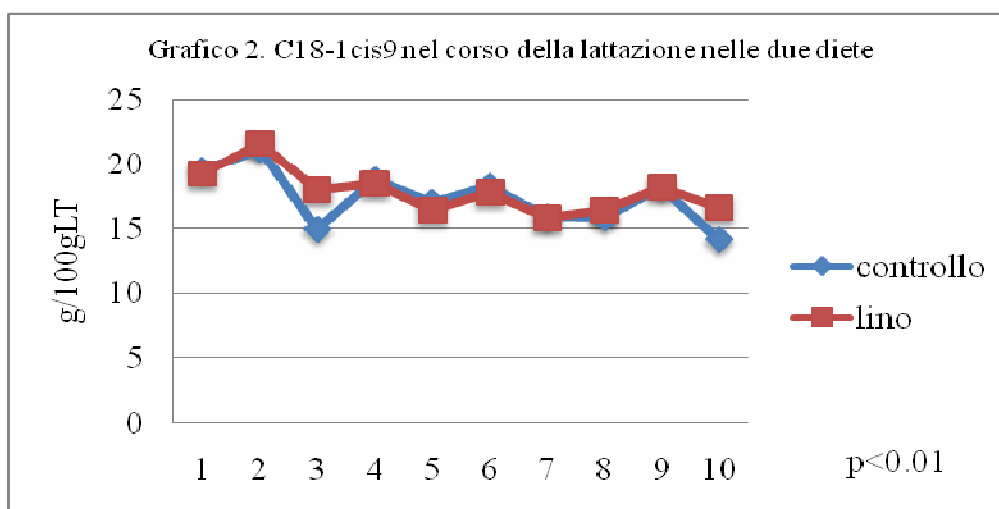
Classi di FA	Gruppo C	Gruppo L	P
SFA	58.60±0.47	48.00±0.53	<0.01
MUFA	23.61±0.30	29.57±0.30	<0.01
PUFA n6	2.39±0.03	2.35±0.03	0.32
PUFA n3	1.04±0.04	2.12±0.04	<0.01
BCFA	1.21±0.02	1.02±0.02	<0.01
OCFA	1.63±0.02	1.39±0.02	<0.01
TFA	3.42±0.26	8.83±0.26	<0.01
ID14	1.74±0.08	1.31±0.08	<0.01
ID16	3.53±0.09	2.73±0.09	<0.01
ID18	66.22±0.62	63.10±0.62	<0.01

SFA: Acidi Grassi Saturi; MUFA: Acidi Grassi Monoinsaturi; PUFA: Acidi Grassi Polinsaturi;  
BCFA: Acidi Grassi a Catena Ramificata; OCFA: Acidi Grassi a Catena Dispari; TFA: Acidi Grassi *Trans*.  
ID14,  $[C14:1/(C14:0+C14:1)] \times 100$ .  
ID16,  $[C16:1/(C14:0+C16:1)] \times 100$ .  
ID18,  $[C18:1cis9/(C18:0+C18:1cis9)] \times 100$ .



L'effetto del tipo di alimentazione risulta evidente dal grafico 1 in cui, come preannunciato, è riportata l'interazione dei due fattori principali. Si nota, infatti, che l'aumento dei MUFA nel gruppo L è quasi immediato (30.49 g/100g LT al

TD2), ossia significativamente più elevato rispetto a 24.59 g/100g del TD1 e che tra i due gruppi si crea una differenza di circa 8g/100g LT che si mantiene inalterata per l'intera durata della prova. Tale aumento non dipende, però, come potrebbe logicamente essere atteso, dall'aumento della concentrazione di OA, che, come è noto è il MUFA più rappresentato.



In effetti, come rappresentato nel grafico 2, la concentrazione del C18:1cis9 (OA) nelle due tesi è pressoché sovrapponibile e l'OA sembra essere uno dei pochi FA a non risentire dell'effetto alimentazione (17.39 g/100g LT in C vs 17.84 g/100g LT in L, P=0.26) (tabella 9.1a). La sua concentrazione, quindi, come

atteso, diminuisce con l'avanzare della lattazione, passando da circa 20 g/100g LT all'inizio della prova, a poco più di 15 g/100g LT al TD10 (tabella 8.2a). L'incremento dei MUFA è legato, invece, a quello dei *trans* FA, la cui quantità, in termini di pool, risulta essere pari rispettivamente a 3.42 g/100g LT nel gruppo C e 8.83 g/100g LT nel gruppo L ( $P < 0.01$ ) (tabella 8.1b). La concentrazione dei TFA aumenta significativamente nel corso del tempo ed in particolare durante la prima fase della lattazione, passando da 3.08 g/100g LT al TD1 a 7.12 g/100g LT al TD5 (tabella 8.1b). Ciò dipende da entrambi i fattori di variazione inseriti nel modello, ma in particolare dal fattore dieta. Nel gruppo L i TFA, infatti, aumentano rapidamente ed in maniera sensibile, tanto che la loro concentrazione raddoppia nel giro di una settimana (al TD1 sono 3.07 g/100g LT mentre al TD2 divengono 6.02 g/100g LT) e continua ad aumentare fino al TD9 (10.11 g/100g LT) (grafico 3).

Come viene riportato in tabella 8.1a, la quantità di VA rinvenuta nel latte del gruppo L, è risultata pari a 5.87 g/100g LT, ovvero cinque volte superiore rispetto a quella del gruppo C (1.72 g/100g LT). Tale aumento, come è noto, non è spiegabile solo in funzione delle diverse tesi alimentari, ma anche in relazione alla fisiologia che presiede alla lattazione, tant'è che, come mostrato in tabella 8.2a, la concentrazione di VA cresce progressivamente nel corso dei 10 campionamenti successivi. Tuttavia il grafico 4 rende evidente come il fattore dieta sia comunque quello più significativo nel determinare l'aumento del VA. In effetti, nel latte L il livello di VA raddoppia fin dal TD2, (3.51 g/100g LT vs 1.73 g/100g LT nel TD1), e subisce un ulteriore raddoppio dal TD2 al TD3 (6.68 g/100g LT) per poi stabilizzarsi fino al TD9. Solo nell'ultimo TD si riscontra una diminuzione significativa (5.69 g/100g LT) rispetto ai valori precedenti.

Nel latte del gruppo C, invece, la quantità di VA si è mantenuta pressoché costante nel corso del tempo, attestandosi attorno ad un valore medio di 3.42 g/100g LT.

Tabella 8.2a- Composizione acidica del latte nel corso della lattazione  
(g/100g lipidi totali)

Acidi grassi	TD1	TD2	TD3	TD4	TD5	TD6	TD7	TD8	TD9	TD10	P
4:0	4.27 ±0.11	4.65 ±0.11	4.86 ±0.11	5.21 ±0.11	4.32 ±0.11	4.90 ±0.11	4.92 ±0.11	4.90 ±0.11	4.77 ±0.11	4.86 ±0.11	<0.01
6:0	5.65 ±0.14	4.10 ±0.14	4.13 ±0.14	4.39 ±0.14	4.11 ±0.14	3.18 ±0.14	3.68 ±0.14	3.71 ±0.14	3.17 ±0.14	4.53 ±0.14	<0.01
8:0	5.90 ±0.18	3.75 ±0.18	4.13 ±0.18	4.17 ±0.18	3.86 ±0.18	2.91 ±0.18	3.58 ±0.18	3.56 ±0.18	3.02 ±0.18	4.28 ±0.18	<0.01
10:0	6.45 ±0.19	5.29 ±0.19	5.91 ±0.18	5.68 ±0.19	5.16 ±0.18	4.58 ±0.18	5.59 ±0.18	5.43 ±0.18	4.67 ±0.18	5.84 ±0.18	<0.01
11:0	0.15 ±0.03	0.04 ±0.03	0.04 ±0.03	0.04 ±0.03	0.04 ±0.03	0.03 ±0.03	0.04 ±0.03	0.04 ±0.03	0.03 ±0.03	0.05 ±0.03	0.30
12:0	3.50 ±0.08	2.90 ±0.08	3.28 ±0.08	3.20 ±0.08	2.97 ±0.08	2.66 ±0.08	3.01 ±0.08	2.85 ±0.08	2.66 ±0.08	3.19 ±0.08	<0.01
13:0	0.06 ±0.01	0.06 ±0.01	0.06 ±0.01	0.06 ±0.01	0.06 ±0.01	0.06 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.06 ±0.01	<0.01
14- iso	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.08 ±0.01	0.09 ±0.01	0.08 ±0.01	0.09 ±0.01	0.07 ±0.01	0.06 ±0.01	0.08 ±0.01	0.06 ±0.01	<0.01
14:0	9.27 ±0.15	8.79 ±0.15	9.12 ±0.15	9.11 ±0.15	8.77 ±0.14	8.51 ±0.14	9.20 ±0.14	8.57 ±0.15	8.83 ±0.15	9.49 ±0.15	<0.01
14:1	0.17 ±0.01	0.14 ±0.01	0.11 ±0.01	0.14 ±0.01	0.12 ±0.01	0.13 ±0.01	0.14 ±0.01	0.16 ±0.01	0.13 ±0.01	0.17 ±0.01	<0.01
15- iso	0.21 ±0.01	0.27 ±0.01	0.22 ±0.01	0.26 ±0.01	0.22 ±0.01	0.23 ±0.01	0.20 ±0.01	0.20 ±0.01	0.23 ±0.01	0.18 ±0.01	0.01
15-anteiso	0.53 ±0.01	0.53 ±0.01	0.43 ±0.01	0.52 ±0.01	0.45 ±0.01	0.46 ±0.01	0.45 ±0.01	0.43 ±0.01	0.45 ±0.01	0.45 ±0.01	<0.01
15:0	0.87 ±0.01	0.88 ±0.01	0.75 ±0.01	0.81 ±0.01	0.84 ±0.01	0.77 ±0.01	0.80 ±0.01	0.74 ±0.01	0.82 ±0.01	0.83 ±0.01	<0.01
16-iso	0.26 ±0.01	0.23 ±0.01	0.19 ±0.01	0.21 ±0.01	0.19 ±0.01	0.19 ±0.01	0.17 ±0.01	0.18 ±0.01	0.18 ±0.01	0.17 ±0.01	<0.01
16:0	20.83 ±0.28	20.44 ±0.28	20.61 ±0.27	20.09 ±0.27	20.03 ±0.27	20.31 ±0.27	21.20 ±0.27	20.30 ±0.27	21.05 ±0.27	21.87 ±0.27	<0.01
16:1 n7	0.95 ±0.02	0.73 ±0.02	0.62 ±0.02	0.63 ±0.02	0.55 ±0.02	0.57 ±0.02	0.69 ±0.02	0.70 ±0.02	0.64 ±0.02	0.69 ±0.02	<0.01
17-anteiso	0.50 ±0.01	0.07 ±0.01	0.08 ±0.01	0.07 ±0.01	0.08 ±0.01	0.07 ±0.01	0.33 ±0.01	0.08 ±0.01	0.06 ±0.01	0.08 ±0.01	<0.01
17:0	0.58 ±0.01	0.50 ±0.01	0.45 ±0.01	0.47 ±0.01	0.51 ±0.01	0.46 ±0.01	0.42 ±0.01	0.40 ±0.01	0.47 ±0.01	0.40 ±0.01	<0.01
17:1	0.17 ±0.05	0.04 ±0.05	0.03 ±0.05	0.04 ±0.05	0.01 ±0.05	0.05 ±0.05	0.01 ±0.05	0.03 ±0.05	0.03 ±0.05	0.02 ±0.05	0.68
18:0	10.08 ±0.26	9.61 ±0.26	11.02 ±0.28	10.41 ±0.26	9.56 ±0.25	10.13 ±0.25	8.71 ±0.25	8.16 ±0.26	10.37 ±0.26	8.47 ±0.26	<0.01
18:1 t9	0.29 ±0.02	0.35 ±0.02	0.46 ±0.02	0.41 ±0.02	0.46 ±0.01	0.47 ±0.01	0.43 ±0.01	0.45 ±0.02	0.46 ±0.02	0.44 ±0.02	<0.01
18:1 t10	0.42 ±0.04	0.53 ±0.04	0.59 ±0.04	0.55 ±0.04	0.70 ±0.04	0.68 ±0.04	0.67 ±0.04	0.64 ±0.04	0.62 ±0.04	0.68 ±0.04	<0.01
18:1 t11	1.73 ±0.22	2.47 ±0.22	4.17 ±0.22	3.30 ±0.22	4.55 ±0.22	4.51 ±0.22	4.37 ±0.22	4.65 ±0.22	4.41 ±0.22	3.81 ±0.22	<0.01
18:1t12+c 7	0.37 ±0.01	0.53 ±0.01	0.69 ±0.01	0.60 ±0.01	0.70 ±0.01	0.66 ±0.01	0.71 ±0.01	0.69 ±0.01	0.75 ±0.01	0.74 ±0.01	<0.01
18:1 t13	0.30 ±0.01	0.37 ±0.01	0.53 ±0.01	0.44 ±0.01	0.49 ±0.01	0.48 ±0.01	0.54 ±0.01	0.53 ±0.01	0.57 ±0.01	0.58 ±0.01	<0.01

18:1 c9	19.40 ±0.36	21.39 ±0.36	16.46 ±0.35	18.64 ±0.35	16.71±0.35	18.03 ±0.35	15.85 ±0.35	16.10 ±0.35	18.19 ±0.35	15.37 ±0.35	<0.01
18:1 c11	0.25 ±0.01	0.29 ±0.01	0.27 ±0.01	0.27 ±0.01	0.30 ±0.01	0.28 ±0.01	0.27 ±0.01	0.27 ±0.01	0.24 ±0.01	0.23 ±0.01	<0.01
18:1 c12	0.21 ±0.02	0.40 ±0.02	0.41 ±0.01	0.41 ±0.01	0.53 ±0.01	0.46 ±0.01	0.49 ±0.01	0.43 ±0.01	0.47 ±0.02	0.48 ±0.01	<0.01
18:1 c13	0.15 ±0.01	0.14 ±0.01	0.16 ±0.01	0.17 ±0.01	0.19 ±0.01	0.18 ±0.01	0.19 ±0.01	0.23 ±0.01	0.19 ±0.01	0.22 ±0.01	<0.01
18:1 c14	0.41 ±0.02	0.51 ±0.02	0.67 ±0.02	0.61 ±0.02	0.59 ±0.02	0.61 ±0.02	0.67 ±0.02	0.69 ±0.02	0.72 ±0.02	0.70 ±0.02	<0.01
18:1 c15	0.46 ±0.15	0.07 ±0.15	0.08 ±0.15	0.08 ±0.15	0.10 ±0.14	0.08 ±0.14	0.09 ±0.14	0.10 ±0.14	0.10 ±0.14	0.11 ±0.14	0.75

Tabella 8.2b- Composizione acidica del latte nel corso della lattazione  
(g/100g di lipidi totali) (seconda parte)

Acidi grassi	TD1	TD2	TD3	TD4	TD5	TD6	TD7	TD8	TD9	TD10	P
C18:2 t9,t12	0.07 ±0.01	0.10 ±0.01	0.17 ±0.01	0.15 ±0.01	0.21 ±0.01	0.20 ±0.01	0.20 ±0.01	0.20 ±0.01	0.18 ±0.01	0.19 ±0.01	<0.01
LA	1.93 ±0.04	2.39 ±0.04	1.92 ±0.04	2.19 ±0.04	2.19 ±0.04	2.15 ±0.04	2.15 ±0.04	2.10 ±0.04	1.95 ±0.04	1.89 ±0.04	<0.01
ALA	0.76 ±0.04	1.37 ±0.04	1.33 ±0.04	1.29 ±0.04	1.32 ±0.04	1.36 ±0.04	1.72 ±0.04	1.70 ±0.04	1.59 ±0.04	1.41 ±0.04	<0.01
C20:0	0.18 ±0.01	0.19 ±0.01	0.19 ±0.01	0.21 ±0.01	0.20 ±0.01	0.21 ±0.01	0.18 ±0.01	0.18 ±0.01	0.21 ±0.01	0.17 ±0.01	<0.01
RA	0.77 ±0.08	1.13 ±0.08	1.48 ±0.08	1.45 ±0.08	1.62 ±0.08	1.81 ±0.08	1.74 ±0.08	2.04 ±0.08	1.84 ±0.08	1.67 ±0.08	<0.01
C21:0	0.06 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.06 ±0.01	0.06 ±0.01	0.06 ±0.01	0.08 ±0.01	0.07 ±0.01	0.09 ±0.01	0.07 ±0.01	<0.01
C20:2	0.01 ±0.01	0.02 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.02 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	<0.01
AA	0.09 ±0.01	0.10 ±0.01	0.07 ±0.01	0.08 ±0.01	0.08 ±0.01	0.08 ±0.01	0.09 ±0.01	0.08 ±0.01	0.08 ±0.01	0.07 ±0.01	<0.01
C22:0	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.10 ±0.01	0.11 ±0.01	0.10 ±0.01	0.09 ±0.01	<0.01
EPA	0.03 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.06 ±0.01	0.05 ±0.01	0.04 ±0.01	<0.01
C24:0	0.05 ±0.01	0.04 ±0.01	0.04 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.04 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	0.05 ±0.01	<0.01
C24:1	0.02 ±0.01	0.02 ±0.01	0.01 ±0.01	0.02 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.02 ±0.01	0.01 ±0.01	<0.01
DPA	0.01 ±0.01	0.10 ±0.01	0.08 ±0.01	0.09 ±0.01	0.01 ±0.01	0.09 ±0.01	0.09 ±0.01	0.09 ±0.01	0.10 ±0.01	0.08 ±0.01	<0.01
DHA	0.03 ±0.01	0.04 ±0.01	0.03 ±0.01	0.04 ±0.01	0.04 ±0.01	0.03 ±0.01	0.03 ±0.01	0.03 ±0.01	0.04 ±0.01	0.03 ±0.01	<0.01

TD: Test Day; LA: Acido Linoleico, C18:2 c9,c12; ALA: Acido  $\alpha$ -Linolenico, C18:3 c9, c12,c15; RA: Acido Rumenico, C18:2 c9,t11; AA: Acido Arachidonico, C20:4 c5,c8,c11,c14; EPA: C20:5 c5,c8,c11,c14,c17; DPA: C22:5 c7,c10,c13,c16,c19; DHA: C22:6 c4,c7,c10,c13,c16,c19.

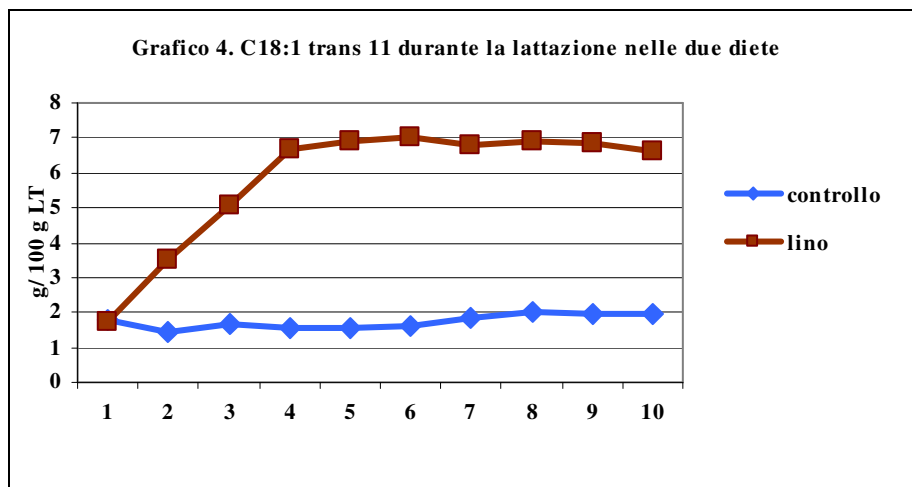
Tabella 8.3 – Classi di acidi grassi ed indici nel latte durante la lattazione  
(g/100g lipidi totali)

	TD1	TD2	TD3	TD4	TD5	TD6	TD7	TD8	TD9	TD10	P
SFA	58.39 ±0.64	52.71 ±0.65	55.95 ±0.64	55.15 ±0.66	51.65 ±0.64	50.21 ±0.66	52.51 ±0.63	50.37 ±0.64	51.28 ±0.64	54.83 ±0.64	<0.01
MUFA	25.95 ±0.42	28.50 ±0.42	25.89 ±0.41	26.78 ±0.41	26.49 ±0.41	27.72 ±0.41	25.61 ±0.41	26.20 ±0.41	28.07 ±0.41	24.71 ±0.41	<0.01
PUFA	2.16 ±0.04	2.66 ±0.04	2.23 ±0.04	2.43 ±0.04	2.51 ±0.04	2.44 ±0.04	2.45 ±0.04	2.40 ±0.04	2.27 ±0.04	2.16 ±0.04	<0.01
n6	0.84 ±0.05	1.63 ±0.05	1.60 ±0.05	1.50 ±0.05	1.42 ±0.04	1.54 ±0.04	1.90 ±0.04	1.88 ±0.04	1.92 ±0.05	1.56 ±0.04	<0.01
PUFA	0.84 ±0.05	1.63 ±0.05	1.60 ±0.05	1.50 ±0.05	1.42 ±0.04	1.54 ±0.04	1.90 ±0.04	1.88 ±0.04	1.92 ±0.05	1.56 ±0.04	<0.01
n3	±0.05	±0.05	±0.05	±0.05	±0.04	±0.04	±0.04	±0.04	±0.05	±0.04	<0.01
BCFA	1.58 ±0.03	1.21 ±0.03	1.00 ±0.03	1.16 ±0.03	1.04 ±0.03	1.04 ±0.03	1.23 ±0.03	0.95 ±0.03	1.00 ±0.03	0.95 ±0.03	<0.01
OCFA	1.66 ±0.02	1.61 ±0.02	1.42 ±0.02	1.52 ±0.02	1.56 ±0.02	1.48 ±0.02	1.45 ±0.02	1.37 ±0.02	1.54 ±0.02	1.46 ±0.02	<0.01
TFA	3.08 ±0.23	4.33 ±0.23	6.62 ±0.23	5.49 ±0.23	7.12 ±0.23	7.03 ±0.23	6.95 ±0.23	7.19 ±0.23	7.00 ±0.23	6.45 ±0.23	<0.01
ID14	1.71 ±0.08	1.51 ±0.08	1.20 ±0.08	1.53 ±0.08	1.33 ±0.08	1.44 ±0.08	1.52 ±0.08	1.81 ±0.08	1.45 ±0.08	1.72 ±0.08	<0.01
ID16	4.41 ±0.09	3.44 ±0.09	2.89 ±0.09	2.96 ±0.09	2.62 ±0.09	2.66 ±0.09	3.07 ±0.09	3.29 ±0.09	2.91 ±0.09	2.99 ±0.09	<0.01
ID18	65.88 ±0.60	69.12 ±0.61	60.11 ±0.60	64.29 ±0.60	63.62 ±0.59	64.06 ±0.59	64.68 ±0.59	66.40 ±0.60	63.75 ±0.60	64.69 ±0.60	<0.01

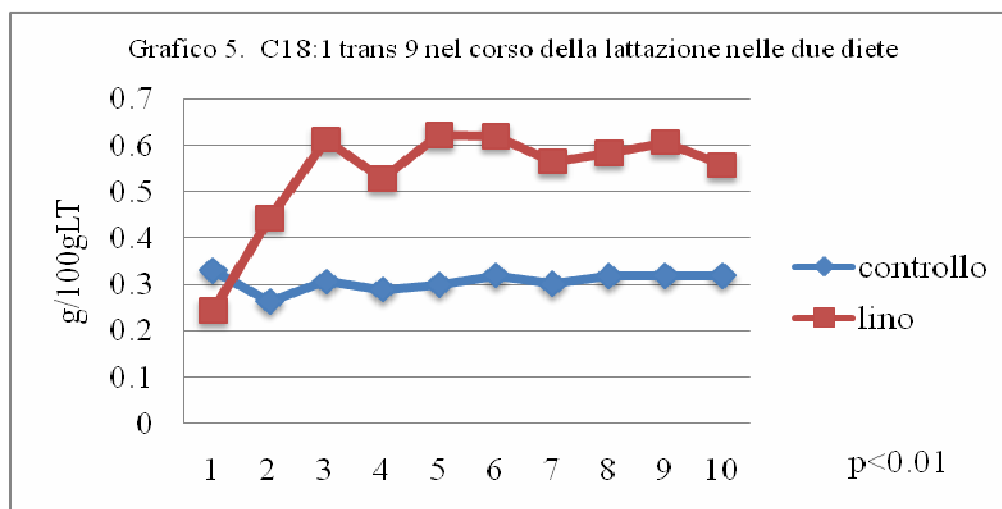
TD: Test Day; SFA: Acidi Grassi Saturi; MUFA: Acidi Grassi Monoinsaturi; PUFA: Acidi Grassi Polinsaturi;  
BCFA: Acidi Grassi a Catena Ramificata; OCFA: Acidi Grassi a Catena Dispari; TFA: Acidi Grassi *Trans*.  
ID14,  $[C14:1/(C14:0+C14:1)] \times 100$ .  
ID16,  $[C16:1/(C14:0+C16:1)] \times 100$ .  
ID18,  $[C18:1cis9/(C18:0+C18:1cis9)] \times 100$ .

La diversa tesi alimentare si è mostrata un fattore di variazione significativo anche nei confronti dell'EA (C18:1 *trans*-9), ossia il secondo TFA più rappresentato nel pattern specifico dei ruminanti. La concentrazione di tale FA è risultata essere più elevata nel gruppo L che nel gruppo C, rispettivamente 0.54 g/100g LT vs 0.31 g/100g LT (tabella 9.1a). In tabella 9.1.2a, si può apprezzare il trend di crescita dell'EA durante l'intero periodo di prova, in accordo con l'incremento generale dei *trans*, a partire dal TD3, in cui la quantità è risultata pari a 0.46 g/100g LT, contro 0.29 g/100g LT del TD1; dopo di che non ci sono altre variazioni significative.

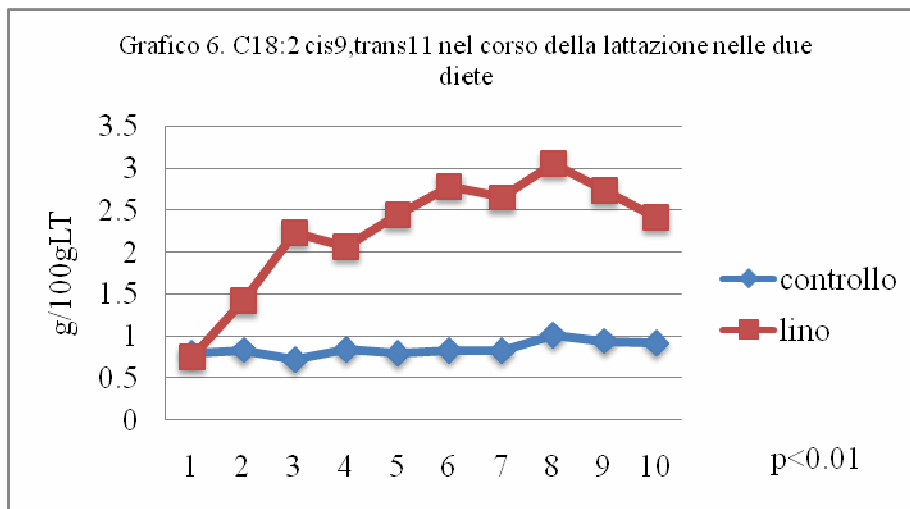




Il grafico 5 conferma nuovamente che il fattore dieta è quello che influenza maggiormente l'aumento dei TFA. In effetti, si può notare che l'EA è rinvenibile in quantità sensibilmente più elevate nel latte L rispetto al latte C e che tale incremento fa assistere al proprio picco nel periodo di tempo intercorso tra il TD1 (0.24 g/100g LT) e il TD3 (0.61 g/100g LT). Dopo tale picco, però, la concentrazione dell'EA si mantiene pressoché costante fino a fine prova, contrariamente a quanto osservato nel latte C, nel quale la concentrazione di EA non fa assistere a nessun cambiamento significativo.



In sostanza, se è vero che la dieta lino comporta un aumento complessivo della concentrazione dei TFA, è altrettanto vero che tale incremento riguarda soprattutto il VA, che è ritenuto avere effetti potenzialmente benefici sulla salute umana in funzione della correlazione positiva con il RA. In effetti, è stato riscontrato che, nel corso della prova, la concentrazione del VA passa dal 50 a circa il 66% del totale dei TFA. Come è noto, il VA è il precursore, a livello tissutale, del CLA RA (C18:2*cis*9,*trans*11), che sembra avere effetti positivi nei confronti della prevenzione delle CHD, di alcune tipologie di tumore e, più in generale, della sindrome metabolica. In questo senso, è da leggersi come un risultato entusiasmante il fatto che il latte L è risultato contenere una quantità di RA tre volte superiore rispetto a quello presente nel latte C (0.85 g/100g LT nel latte C vs 2.26 g/100g LT nel latte L) (tabella 9.1a).



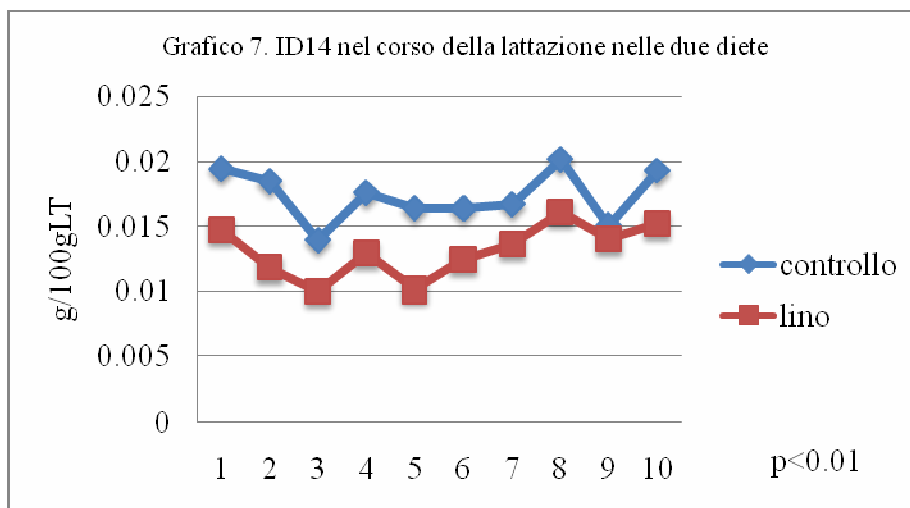
Questo risultato, paragonabile a quelli ottenuti da Bu et al. (2007), con vacche da latte integrate con farina di soia integrale e da Tsiplakou et al. (2006) e da Addis et al. (2005), con pecore da latte alimentate al pascolo. Evidentemente, quindi, l'integrazione della dieta delle pecore da latte con lino estruso sembra poter essere la terza via per ottenere un arricchimento naturale in RA in modo efficace ed efficiente (Addis et al. 2005; Tsiplakou et al. 2006; Bu et al. 2007; Chilliard et al., 2007).

Dall'analisi dei dati disponibili è stato possibile mettere in evidenza che la concentrazione di RA nel latte cresce nel corso del tempo, passando da 0.77 g/100g LT del TD1, a 1.67 g/100g LT del TD10 (tabella 9.1.2a). Tuttavia, appare evidente che sia proprio l'effetto dieta il fattore che maggiormente influenza tale crescita e che la promuove (grafico 6). Il trend di crescita registrato ha mostrato che la concentrazione di RA cresce a partire dal TD2 (1.42 g/100g LT al TD2 vs 0.75 g/100g LT al TD1), continua ad aumentare fino al TD5 (2.44 g/100g LT), per poi mantenersi pressoché costante per tutta la durata della prova. Nel latte del gruppo C, invece, il valore riscontrato al tempo TD1 si mantiene pressoché invariato per l'intera durata della sperimentazione (grafico 6).

La prova di alimentazione condotta sembra spiegare l'incremento della concentrazione di RA nel latte del gruppo L, esclusivamente in funzione della maggiore presenza del suo precursore VA. In effetti, l'eventuale influenza della dieta sulla sintesi ruminale di RA sembra poter essere esclusa, in quanto la dieta L è fonte di acido  $\alpha$ -linolenico (1.89 g/100g nel latte LT L vs 0.87 g/100g in quello C,  $P < 0.01$ ), mentre l'acido linoleico è risultato significativamente superiore nel gruppo C (2.18 g/100g LT nel gruppo C vs 2.00 g/100g LT in quello L). È noto, che durante il processo di bioidrogenazione ruminale dell'acido  $\alpha$ -linolenico ad acido stearico, non si produce RA, ma solo VA, in quanto il C18:3 *cis*9, *cis*12, *cis*15 viene trasformato in C18:3 *cis*9, *trans*11, *cis*15, e, successivamente, in C18:2 *trans*11, *cis*15 a seguito alla saturazione del doppio legame in posizione *cis*9 e, quindi, dopo una seconda saturazione a carico del doppio legame in posizione *cis*15, a C18:1 *trans*11 (Destailats et al., 2005). Dunque l'acido linolenico determina un aumento del RA solo indirettamente, cioè attraverso la produzione di VA, che dal rumine passa poi ai tessuti. Come accennato in precedenza, a livello dei tessuti, il VA è convertito in RA per azione dell'enzima stearoil-CoA desaturasi (SCD), che impiega come substrato principale l'acido stearico convertendolo in acido oleico. Tuttavia, è noto che l'SCD agisce anche su substrati diversi dal VA, quali il C14:0 ed il C16:0, convertiti nei rispettivi monoinsaturi C14:1, C16:1. Ciò a dire che l'attività della SCD può essere convenientemente stimata attraverso indici che mettono in relazione i substrati

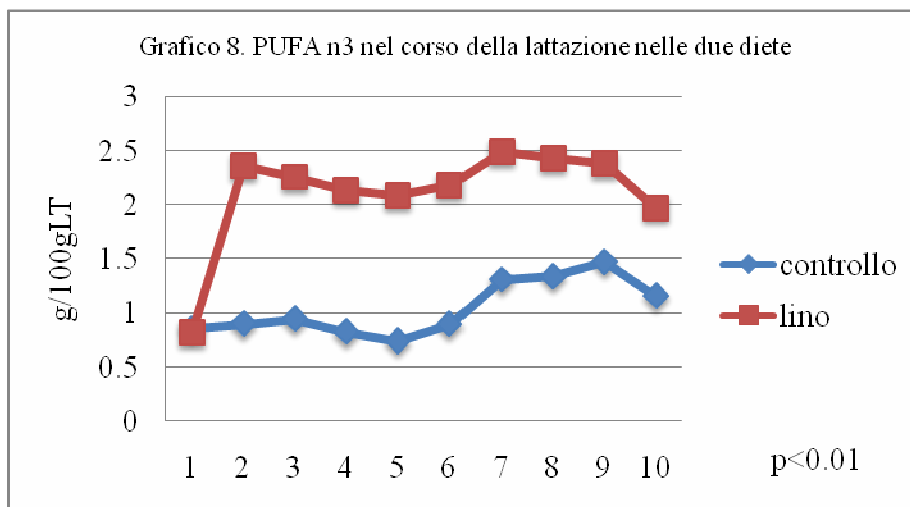
con i prodotti di reazione. In particolare, il C14:0, contrariamente agli altri substrati, è utilizzato solo a livello dei tessuti per cui, la quantità di acido miristoleico (C14:1) dipende soltanto dall'attività dell'enzima SCD e non dall'azione dei batteri come avviene, invece, per gli altri FA e ciò rende il rapporto  $C14:1/(C14:0+C14:1)$  (ID14) particolarmente adatto per stimare l'attività della  $\Delta 9$ -desaturasi (Malau-Aduli, et al., 1998; Bernard et al., 2006)

Come si evince dal grafico 7 la dieta ha influenzato l'attività della SCD, nel senso che nel gruppo L è risultata significativamente inferiore per l'intero periodo di prova rispetto al gruppo C. Ciò sta ad indicare che l'introduzione del lino estruso nella razione ha determinato, da un lato, un grande aumento del VA (substrato di reazione della SCD per la produzione di RA), dall'altro, una diminuzione dell'attività dell'SCD, sulla quale sia il VA, che i PUFA agiscono con una sorta di meccanismo a feed-back. Pur tuttavia, il fortissimo incremento di VA sembra essere stato sufficiente a compensare la diminuzione dell'attività dell'SCD, tanto che il latte L è risultato contenere una quantità di RA tripla rispetto a quella del latte C.



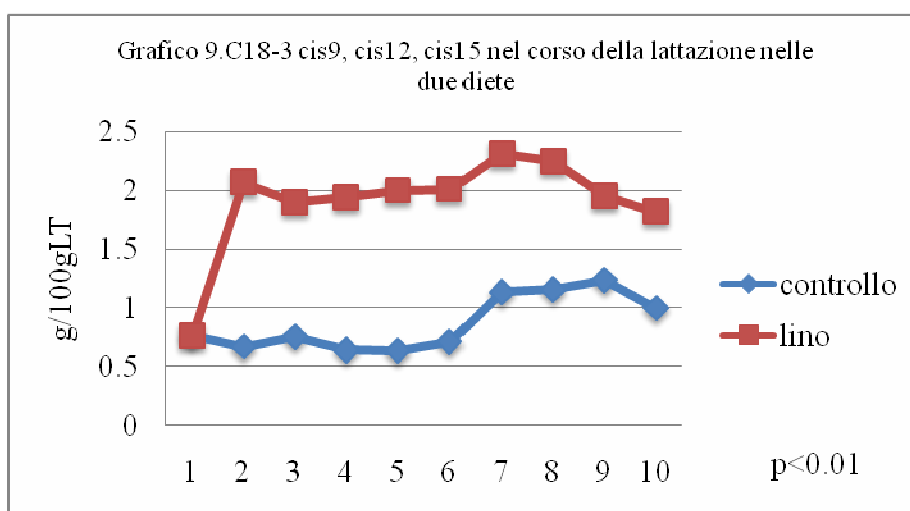
Il fatto che l'introduzione nella razione del lino estruso non abbia modificato la sintesi ruminale di RA è confermato anche dall'analisi degli acidi grassi ramificati (BCFA) e a catena dispari (OCFA). Tali classi di acidi, infatti,

sono dei buoni indicatori dell'attività ruminale in quanto sono di derivazione batterica. I BCFA derivano soprattutto dai batteri cellulositici, mentre gli OCFA da quelli amilolitici (Berian et al., 2000). Dalla tabella 8.1b si evince che l'introduzione del lino nell'alimentazione delle pecore ha determinato una diminuzione della quantità di BCFA e di OCFA nel latte da esse derivato. Tale risultato sembra poter essere attribuito al fatto che, al momento della formulazione delle diverse diete, la razione del gruppo C ha visto coprire la quota di energia apportata alla dieta L dal lino estruso, con amidi, al fine di ottenere due formulazioni isoenergetiche. Tuttavia la diminuzione di BCFA ed OCFA, ancorché significativa, risulta comunque di modesta entità se la si considera in termini di quantità assoluta. Ciò a dire, che la razione L ha sì determinato alcune modificazioni dell'ambiente ruminale, ma che queste comunque sono risultate essere di lieve entità.

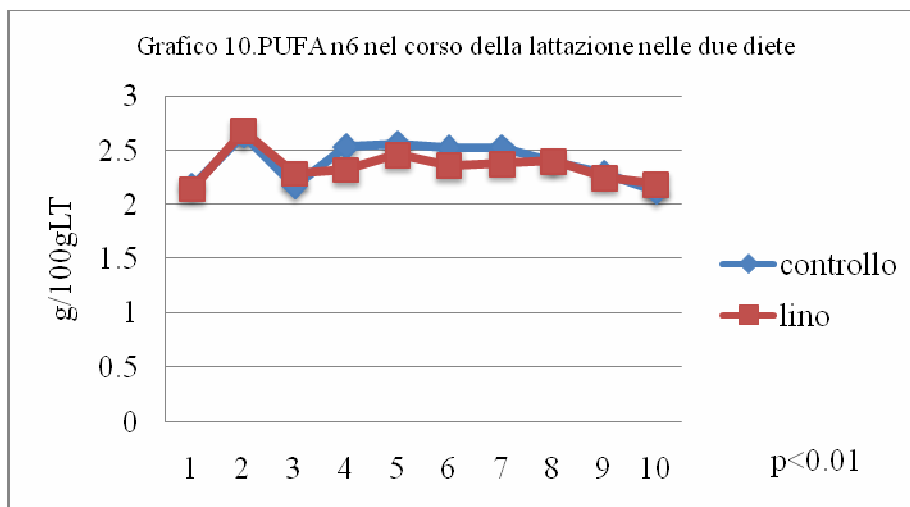


Per quanto riguarda i PUFA, l'analisi dei dati riscontrati ha permesso di evidenziare risposte completamente differenti in funzione delle 2 diverse tesi alimentari. In effetti, nel latte L si assiste ad un incremento di PUFA n-3 più che doppio rispetto a quanto riscontrato nel latte dell'altra tesi (1.04 g/100g della dieta C vs 2.12 g/100g, della dieta L) (tabella 8.1b). Inoltre, in accordo con quanto registrato per le altre classi di FA, anche per i PUFA n-3 si è assistito ad una

crescita progressiva della concentrazione nel corso della lattazione, portando ad evidenziare il picco di presenza in prossimità dell'intervallo TD7 al TD9, dopo il quale il contenuto medio in n-3 è tornato a diminuire (tabella 9.1.2b). Tuttavia, il grafico 8 mette in evidenza come l'incremento della concentrazione di PUFA n-3 si possa registrare già a partire dal tempo TD2, al quale essa risulta essere circa tripla rispetto al primo campionamento.

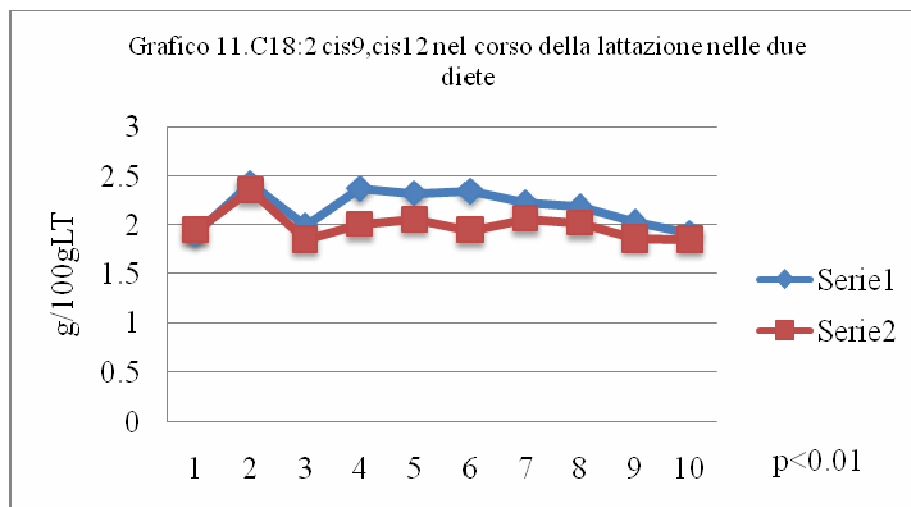


Tale fenomeno è spiegabile, pressoché, totalmente in funzione della crescita della quantità di acido  $\alpha$ -linolenico(ALA), che, come ricordato in precedenza, è risultata pari a 1.89 g/100g nel latte L, rispetto agli 0.87 g/100g della dieta C (tabella 9.1a). In effetti, la crescita della concentrazione dell'ALA mostra lo stesso andamento descritto per i PUFA n-3 durante il corso della lattazione (tabella 9.1.2b), ed altrettanto dicasi per quanto riguarda l'interazione fra i due fattori principali inseriti nel modello (grafico 9).



La classe dei PUFA n-6 non subisce l'effetto della dieta ( $P=0.32$ ), infatti, nella dieta C sono presenti mediamente 2.39 g/100g LT vs i 2.35 g/100g LT della dieta L (tabella 9.1b). Mentre, per quanto riguarda il fattore lattazione, nonostante abbia mostrato di variare in modo statisticamente significativo ( $P<0.01$ ), non è stato possibile definirne un trend di variabilità chiaro, tanto che nel grafico 10 le curve C ed L risultano essere quasi completamente sovrapposte. Ciò a dire che la dieta non ha influenzato la concentrazione dei PUFA n-6 nel latte per tutta la durata della prova.

Il comportamento dei PUFA n-6, fondamentalmente, può essere spiegato in funzione di quello del LA (C18:2*cis*9,*cis*12), che, tra questi, è il più rappresentativo. In questo senso, è da notare che il contenuto di LA, così come atteso in funzione del tipo di formulazione delle 2 diverse diete, è risultato significativamente maggiore nel latte C rispetto a quello del latte L (rispettivamente 2.18 g/100g LT vs 2.00 g/100g LT) (Tabella 9.1a). In entrambe le tesi, inoltre, si assiste ad una crescita significativa ( $P<0.01$ ) della concentrazione del LA nel corso della lattazione nell'intervallo TD2 - TD8, dopo di che tale quantità diminuisce di nuovo (tabella 9.2a) (grafico 11).

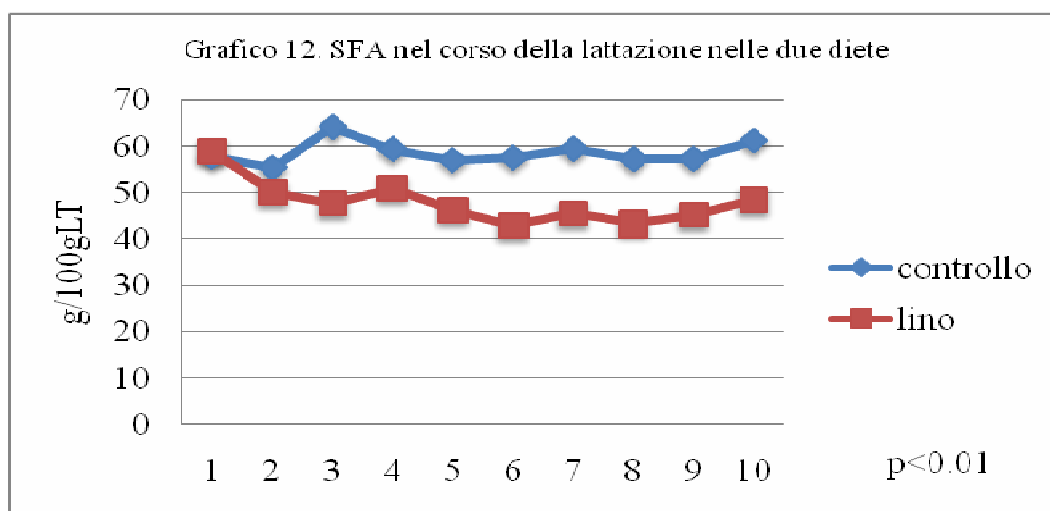


Come è noto, l'acido  $\alpha$ -linolenico e l'acido linoleico sono i precursori, a livello tissutale, rispettivamente dei PUFA della serie n-3 e dei PUFA della serie n-6 attraverso reazioni di elongazione e desaturazione. Da tali reazioni si assiste alla formazione dell'EPA (C20:5cis5,cis8,cis11,cis14,cis17) e del DHA (C22:6cis4,cis7,cis10,cis13,cis16,cis19) a partire dall'ALA, mentre il LA origina l'AA (C20:4cis5,cis8,cis11,cis14). Talvolta questi acidi vengono definiti "essenziali", ma sembra importante, in questa sede, fugare ogni tipo di confusione in merito. Infatti, per "essenziale" si intende un acido grasso per il quale l'organismo umano non possiede il corredo enzimatico che ne consenta la formazione. Relativamente agli acidi AA, EPA e DHA si può affermare che, pur non essendo essenziali in senso stretto, in quanto esistono le vie metaboliche atte a formarli, possono di fatto essere considerati tali, in funzione del fatto che tali vie sono poco efficienti e non garantiscono le quantità necessarie all'organismo. Pertanto, le quantità prodotte a livello tissutale a partire dai precursori, devono essere necessariamente integrate a mezzo della dieta.

Alla luce delle osservazioni fatte in precedenza, ci si sarebbe potuti attendere una ripercussione del livello di ALA e LA sui loro prodotti, in quanto le due serie di acidi grassi competono per gli stessi enzimi. La diminuzione dell'acido arachidonico nella dieta L (0.10 g/100g LT, vs 0.06 g/100g LT nel latte L) (Tabella 9.1a), farebbe quindi presupporre un aumento di EPA e DHA,

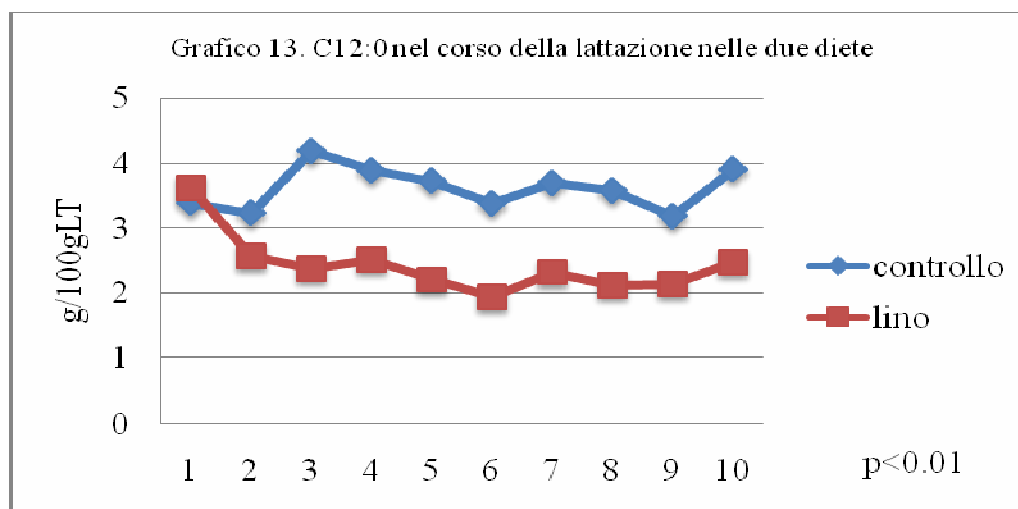


fenomeno che, invece, non è stato registrato (0.05g/100g LT di EPA e 0.03 g/100g LT di DHA sia in C che in L) (Tabella 9.1a). Quindi, più che un effetto diretto del LNA sulle reazioni enzimatiche che portano alla formazione dei PUFA n-6 ed n-3, sembrerebbe verificarsi un effetto competizione tra acido linolenico ed acido arachidonico per le posizioni sui fosfolipidi e sui trigliceridi.



La classe degli SFA subisce una diminuzione altamente significativa ( $P<0.01$ ) in relazione alla dieta. Infatti, nel latte C il contenuto medio in SFA è risultato pari a 58.60 g/100g LT, rispetto ai 48.00 g/100g LT nel latte L, ossia circa il 15% in meno (tabella 8.1b). Anche il fattore lattazione è risultato altamente significativo ( $P<0.01$ ) in questo senso (tabella 9.1.2b). Dal grafico 12 è possibile apprezzare che a partire dal TD3 i SFA sono risultati significativamente inferiori nel gruppo L, rispetto al gruppo C, e che tale fenomeno si è mantenuto tale per tutta la restante parte della prova.

L'andamento generale di questa classe va, tuttavia, interpretato in considerazione dei suoi componenti più importanti, ossia l'acido laurico (C12:0), l'acido miristico (C14:0), l'acido palmitico (C16:0) e l'acido stearico (C18:0).

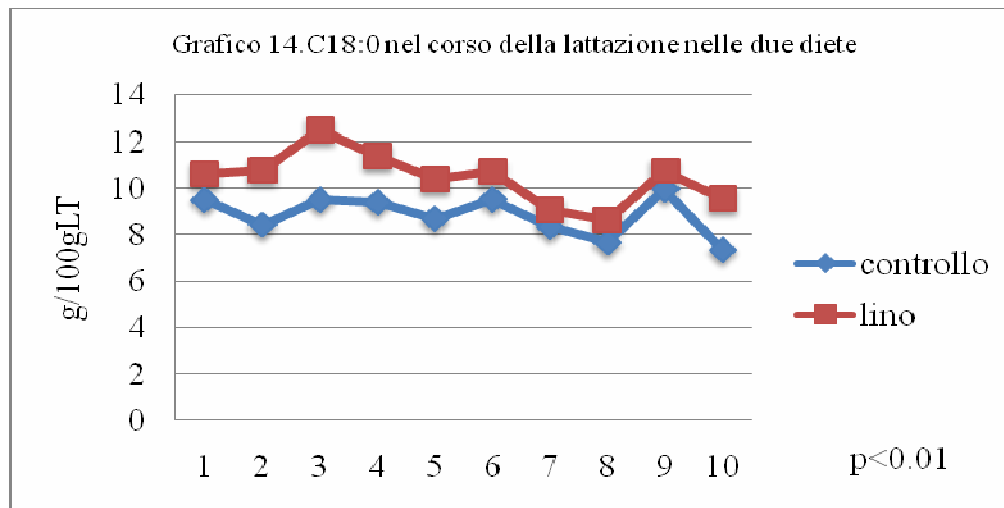


L'acido laurico, presente nel latte C in quantità di 3.62 g/100g LT, diminuisce in conseguenza dell'introduzione di lino estruso nella dieta, tanto che nel latte L la sua quantità è pari a 2.43 g/100g LT (grafico 13). L'acido miristico è pari a 9.85 g/100g LT nel latte C e a 8.08 g/100g LT nel latte L. Tale acido è il più pericoloso per la salute umana e la sua diminuzione nel latte L, pari a circa il 18%, risulta essere particolarmente vantaggiosa (tabella 8.1a). La tabella 8.2a mostra un andamento della concentrazione nel tempo di acido miristico paragonabile a quella dell'acido laurico e lo stesso dicasi a riguardo dell'interazione fra i due fattori di variabilità considerati, anche se in questo caso la differenza fra i due trattamenti è minore.

Anche la quantità di acido palmitico, il più rappresentativo tra i SFA, è minore nel latte L rispetto a quello C (22.87 g/100g LT vs 18.47 g/100g LT) (tabella 8.1a). Tale acido, inoltre, aumenta con il progredire della lattazione, passando da 20.83 g/100g LT del TD1 a 21.87 g/100g LT del TD10 (tabella 8.2a).

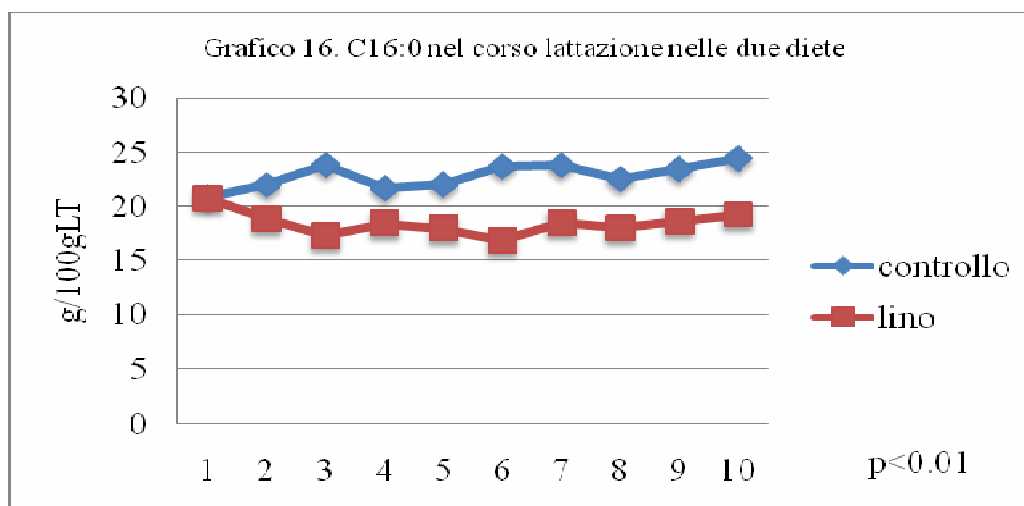
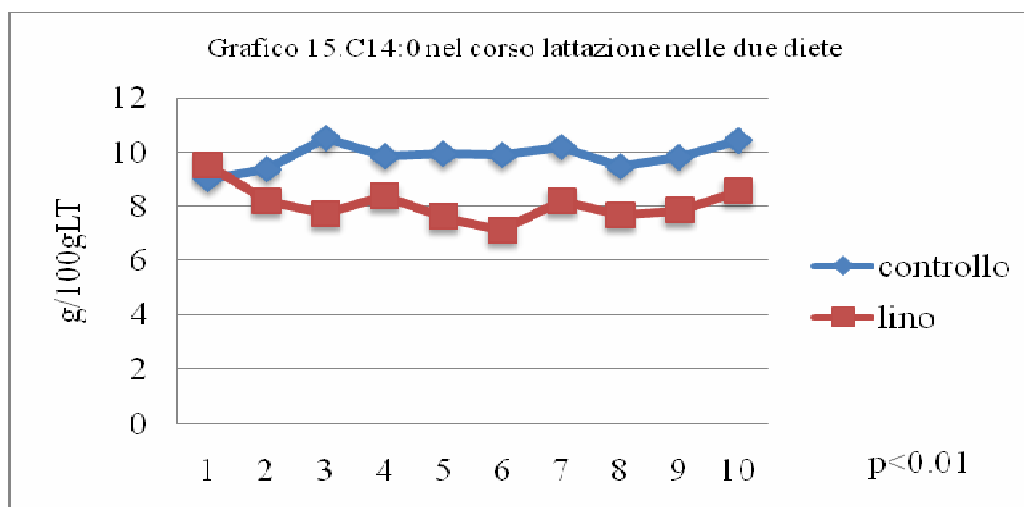
Infine, dalla tabella 8.1a si evince che anche l'acido stearico è influenzato dall'alimentazione, ma in senso opposto rispetto ai precedenti. Ciò a dire, che esso si trova in quantità maggiore nel latte L rispetto al controllo (10.45 g/100g LT vs 8.85 g/100g LT rispettivamente). Il comportamento dell'acido stearico durante la lattazione è, anche in questo caso, opposto rispetto al palmitico (tabella 8.2b); a

partire dal TD7 se ne apprezza la significativa diminuzione, e ciò riguarda entrambe le diete (grafico 14).



D'altronde è noto che, nella ghiandola mammaria la sintesi degli acidi grassi origina dall'acido acetico che, per azione dell' Acetil-CoA-Carbossilasi, viene convertito in malonil-CoA, che a sua volta, per azione della sintasi degli acidi grassi (FAS), viene condensato con molecole di acetato e/o  $\beta$ -idrossibutirrato (Barber et al., 1997). Da qui, per successive condensazioni, l'allungamento della catena può proseguire fino alla formazione di acidi grassi a 14 o 16 atomi di carbonio, ma l'acido palmitico (C16:0) non può essere convertito ad acido stearico (C18:0), (Moore e Christie, 1981). Quindi, il diverso comportamento registrato nella sperimentazione è dovuto al fatto che, gli acidi laurico, miristico e palmitico seguono vie biosintetiche differenti da quello dell'acido stearico.

Tale diverso comportamento è confermato dai grafici 15 e 16, nei quali si riporta l'interazione dei due fattori di variazione principali. Alla luce delle suddette osservazioni, i risultati della ricerca relativi agli SFA possono considerarsi del tutto positivi, dato che è emersa una diminuzione della concentrazione di quelli, per così dire, pericolosi per la salute umana ed aumenta la quantità di acido stearico che viene, prontamente, desaturato dalla  $\Delta^9$  ad acido oleico.



## 9 CARATTERISTICHE TECNOLOGICHE DEL LATTE

Il latte ovino, per sue stese caratteristiche chimico-nutrizionali, è tradizionalmente vocato alla trasformazione casearia per l'ottenimento di formaggi da destinare vario grado di stagionatura e di latti fermentati ed acidificati sul tipo del joddu sardo. In ragione di questo, il lavoro sperimentale ha definito anche le caratteristiche tecnologiche del latte arricchito. Nella tabella 9.1 sono

riportati i parametri lattodinamografici del latte derivato dai due diversi gruppi di alimentazione. Dall'analisi dei dati riferiti, è possibile evidenziare che l'inclusione del lino estruso nella dieta delle pecore non ha determinato differenze statisticamente rilevanti tra le materie prime, fatta eccezione per il parametro r che è risultato migliore nel latte L. Ciò a dire, che il tempo che intercorre tra l'inizio del processo di caseificazione e la coagulazione del latte, è risultato essere inferiore nel latte L, rispetto al latte C. Nessuna differenza di rilevanza statistica è, invece, emersa tra le due tipologie di latte, relativamente alla velocità di formazione del coagulo (K20) e alla consistenza dello stesso (a30).

Tabella 9.1 – Caratteristiche tecnologiche del latte ottenuto dagli animali dei due diversi gruppi di alimentazione

Parametri	Gruppo C (Controllo)	Gruppo L (Lino)	P
r (min.)	19.29±0.48	17.17±0.48	0.02
K20 (min.)	2.01±0.06	2.00±0.06	0.44
a30 (cm)	40.13±1.01	41.62±1.01	0.31
R: tempo di inizio di coagulazione; K20: tempo di formazione del coagulo; a30:consistenza del coagulo.			

## 10 - TRASFERIMENTO DEGLI ACIDI GRASSI DAL LATTE AL FORMAGGIO

Relativamente al trasferimento degli acidi grassi più rappresentativi dal latte al formaggio si rimanda al grafico 17, nel quale tale processo è stato valutato in termini quantitativi ed espresso in termini di g/100g LT. Tale tipo di indagine permette di evidenziare se il processo di caseificazione sia o meno selettivo, relativamente alla traslocazione dal latte al formaggio degli FA e se questo fenomeno possa in qualche modo essere correlato alla diversa tipologia di alimenti impiegati per l'alimentazione animale. Dall'analisi condotta, appare evidente che

non si sono riscontrate variazioni significative per nessun FA considerato indipendentemente dal tipo di dieta a cui si è fatto ricorso, ad indicare, quindi, che il processo di caseificazione, rispetto agli acidi grassi analizzati, non sembra determinare alcun trasferimento selettivo.

Grafico 17 (prima parte). Trasferimento degli acidi grassi dal latte al formaggio.

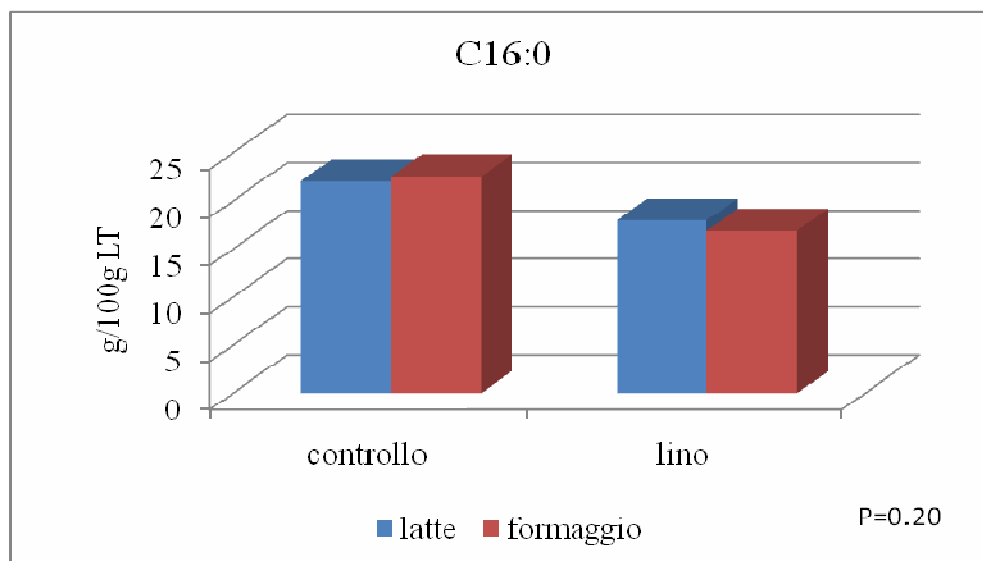
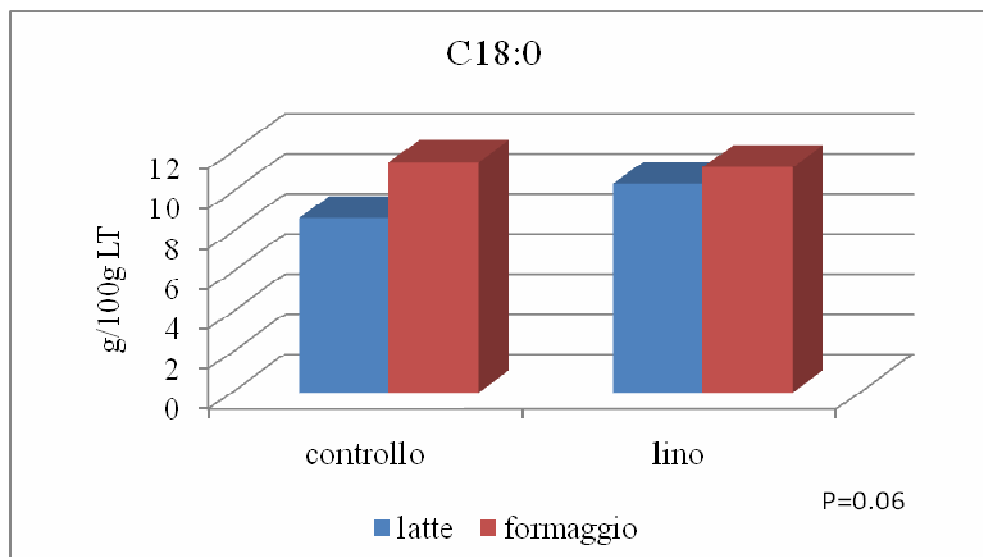
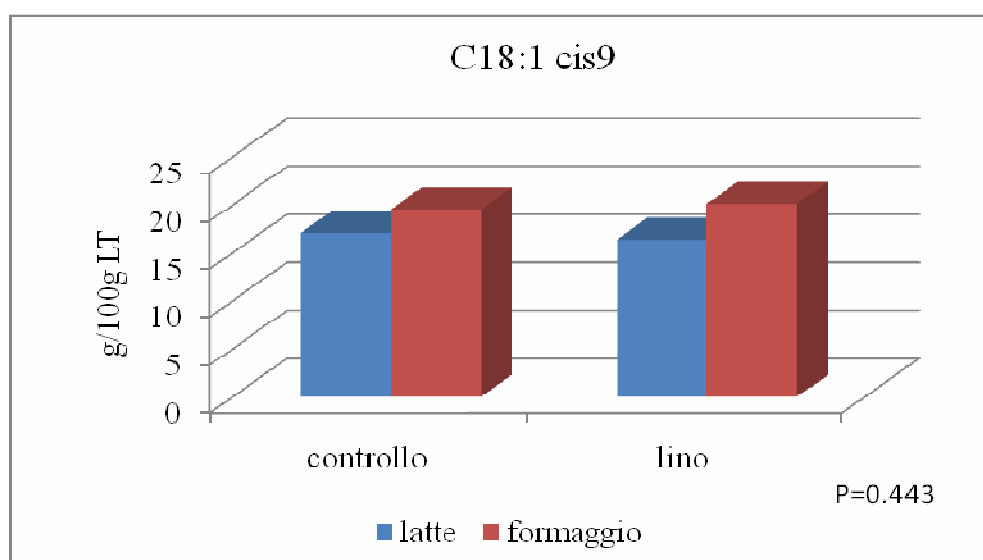
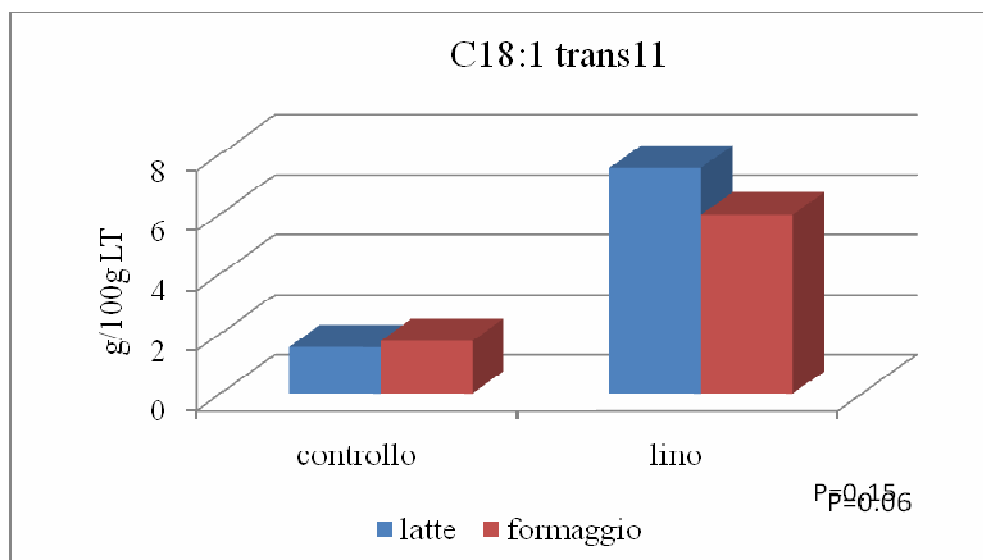
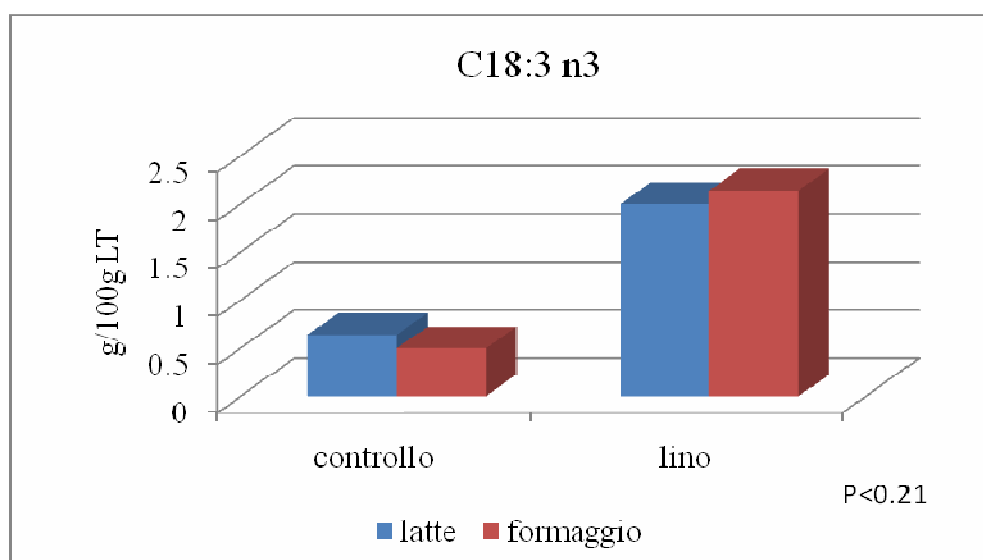
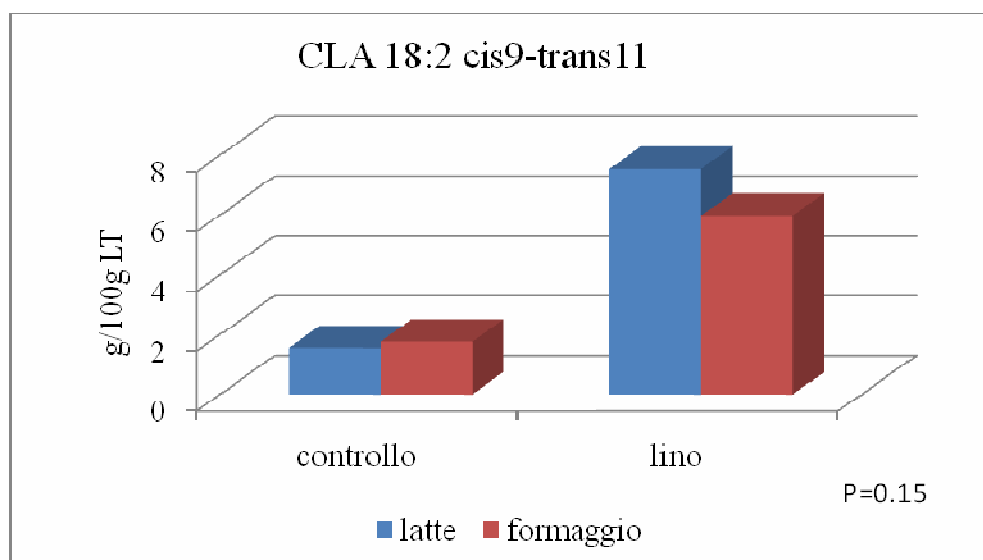
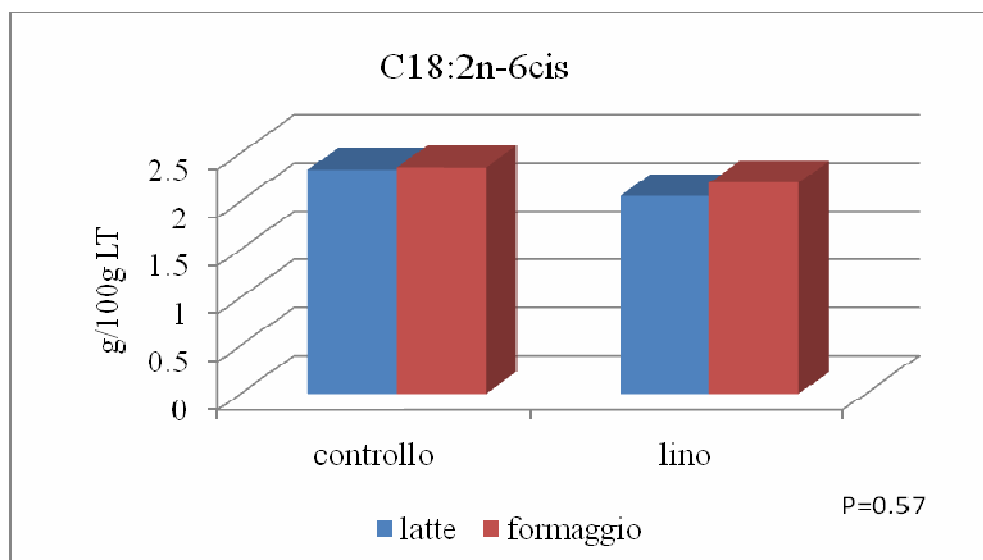


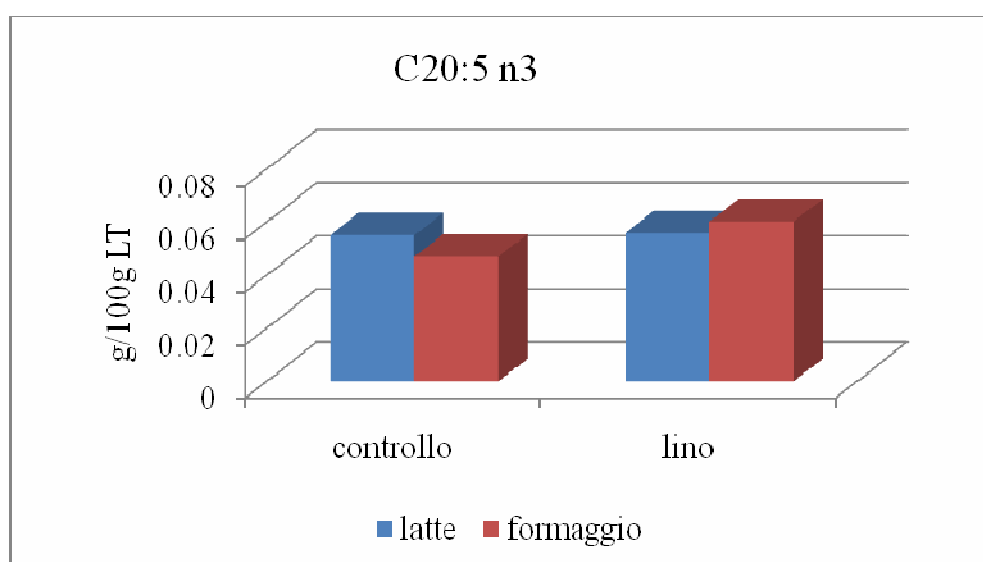
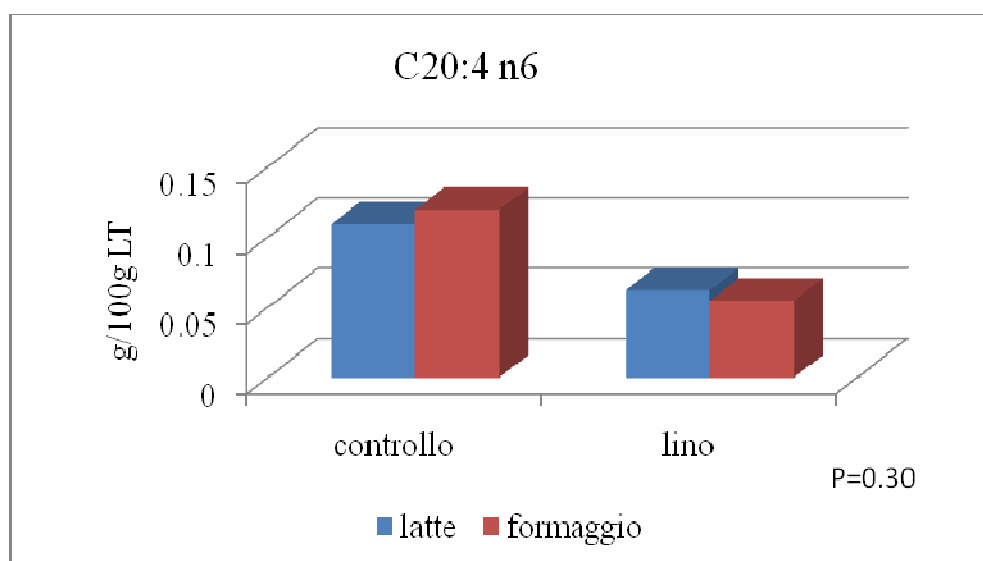
Grafico 17 (seconda parte). Trasferimento degli acidi grassi dal latte al formaggio.

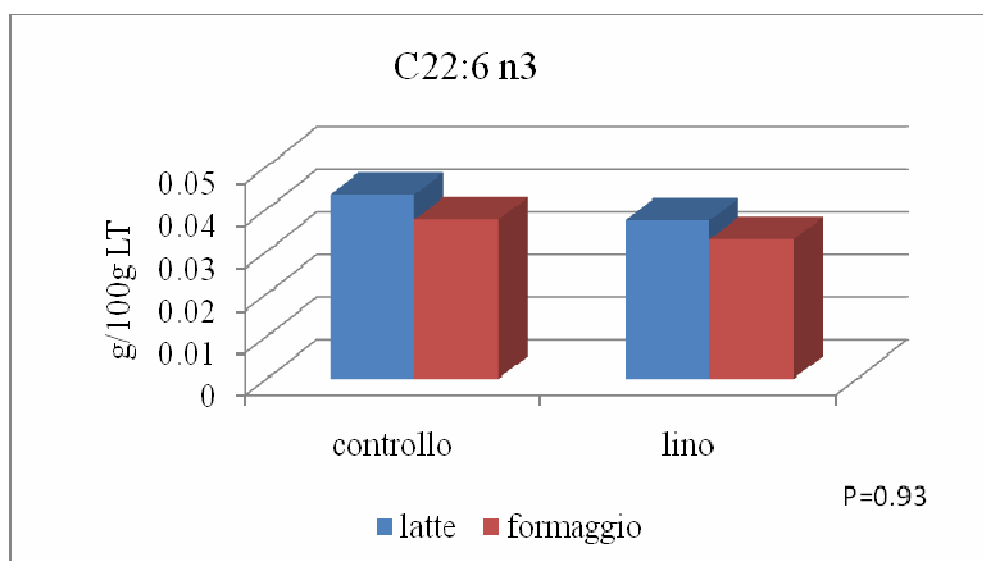












## 11 CARATTERISTICHE NUTRIZIONALI DEL FORMAGGIO

Il lavoro sperimentale, date le ben note ricadute in termini salutistici derivanti dall'assunzione di formaggio, ha teso ad evidenziare le caratteristiche chimico-nutrizionali dei pecorini ottenuti in seno alla prova stessa, al fine di poterne saggiare la salubrità in termini complessivi. Le tabelle 10.1a e 10.1b riportano, rispettivamente, la composizione acidica del formaggio, le classi di acidi grassi ed alcuni indici nutrizionali, in funzione della dieta, espressi come mg/100g di Formaggio Tal Quale (FTP), vale a dire in quantità assoluta.

Dalla tabella 10.1b, si evince che 100g di formaggio prodotto a partire dal latte di soggetti alimentati integrati con il lino estruso apportano 8.20 g di SFA, ossia n 1 g in meno rispetto alla medesima quantità di formaggio prodotto con latte C. Ciò rappresenta un importante risultato in termini salutistici, in funzione della ben nota e ampiamente illustrata azione negativa che gli SFA svolgono nell'indurre le CHD (Ulbricht et al., 1991). La riduzione del contenuto totale di

SFA del pecorino del gruppo L che di per sé si connota come un importante risultato, assume una rilevanza maggiore nel momento in cui si verifica che tale riduzione è da attribuirsi, prevalentemente, alla sostanziale minore presenza di MA. In effetti, è stato evidenziato dalle analisi condotte che in 100 g di formaggio L la quantità di acido miristico è pari a 1.26 g, mentre nella stessa quantità di formaggio C è pari a 1.57 g (Tabella 8.4a). Tale risultato è entusiasmante in funzione delle evidenze scientifiche che nel corso degli anni hanno permesso di evidenziare che il ruolo giocato dai diversi SFA sull'incremento del colesterolo serico è specifico. Infatti, richiamando l'introduzione, si ricorda che, secondo Keys (1967), occorre fare le seguenti distinzioni: i) gli SFA con meno di 10 atomi di carbonio e l'acido stearico (C18:0) non sembrano influenzare la concentrazione ematica del colesterolo, ii) mentre l'acido laurico (C12:0), il miristico (C14:0) ed il palmitico (C16:0), hanno evidenziato la tendenza ad aumentarla. In particolar modo, l'acido miristico risulterebbe essere lo SFA più aterogenico ed il suo potenziale di innalzamento del livello di colesterolo sarebbe addirittura quattro volte superiore rispetto a quello dell'acido palmitico.

Relativamente agli SFA il formaggio L mostra altri aspetti positivi rispetto a quello C, in funzione della minore quantità di acido laurico ( $P=0.01$ ), (366.01 mg/100g FTP gruppo L vs 535 mg/100g FTP gruppo C). La quantità di acido palmitico, invece, non è risultata essere statisticamente differente nel formaggio delle 2 tesi ( $P=0.13$ ) (Tabella 8.4a).

Per quanto riguarda i MUFA, il formaggio L mostra delle caratteristiche nutrizionali superiori a quello C. Infatti, in 100g di formaggio L sono presenti 1.1 g di MUFA in più rispetto agli stessi 100 g di formaggio C. L'importanza dei MUFA per la salute dell'uomo deriva dal fatto che esistono diversi studi che affermano che essi sono in grado di ridurre il livello serico di colesterolo in maniera analoga ai PUFA ma, al contrario dei PUFA n-6, non abbassano il livello di HDL (Ulbricht et al., 1991) e, quindi, sembrano in grado di insistere positivamente sul rapporto LDL/HDL a livello ematico.

Questo ultimo aspetto è molto importante perché le HDL esercitano un ruolo protettivo nei confronti delle CHD in quanto queste, per effetto della loro

funzione di trasporto inverso del colesterolo, sono in grado di rimuovere lo stesso colesterolo dalle cellule periferiche e di ridurre l'entrata delle LDL nelle pareti dei vasi.

Tabella 10.1a – Composizione acidica del pecorino prodotto a partire dal latte delle 2 diverse tesi alimentari (mg/100 g formaggio)

Acidi Grassi	Gruppo C	Gruppo L	P
C8:0	318.08±13.57	208.19±13.57	0.01
C10:0	689.95±136.65	565.76±136.65	0.55
C11:0	6.86±0.29	3.51±0.29	0.01
C12:0	535.74±23.645	366.01±23.65	0.01
C14- iso	16.30±1.77	16.69±1.77	0.88
C14:0	1568.98±68.74	1257.89±68.74	0.03
C14:1	20.23±1.11	19.53±1.11	0.68
C15- iso	57.59±3.39	44.18±3.38	0.05
C15-anteiso	98.46±7.21	85.07±7.21	0.26
C15:0	169.79±9.52	142.02±9.52	0.11
C16-iso	36.49±3.74	36.52±3.74	1.00
C16:0	3795.20 ±190.09	3286.62±190.09	0.13
C16:1 n7	169.12±8.71	142.35±8.71	0.09
C17-anteiso	86.89±7.25	70.14±7.25	0.18
C17:0	102.00±3.17	90.96±3.17	0.07
C17:1	20.07±2.61	18.54±2.61	0.70
C18:0	1935.74±97.79	2183.73±97.78	0.15
C18:1 t6-8	30.45±3.68	104.71±3.68	0.01
C18:1 t9	46.32±5.08	112.50±5.08	0.01
C18:1 t11	297.02±19.54	1161.54±19.54	<0.01
C18:1 t12+c7	64.06±5.32	163.60±5.32	0.01
C18:1 t13	44.51±3.16	114.75±3.16	<0.01
C18:1 c9	3285.12±176.88	3907.00±176.88	0.07
C18:1 c11	47.293±1.81	60.06±1.81	0.01
C18:1 c12	38.68±3.49	109.60±3.49	0.01
C18:1 c13	16.05±2.15	45.60±2.15	0.01
C18:1 c14	79.88±5.40	157.50±5.40	0.01
C18:1 c15	7.48±0.58	18.78±0.58	0.01
C18:2 c9,c12	395.42±18.76	426.12±18.76	0.31
C18:3 c6, c9,c12	8.714±1.56	8.20±1.56	0.83
C18:3 c9, c12,c15	85.79±17.22	415.77±17.22	0.01
C20:0	47.71±4.23	39.48±4.23	0.24
C18:2 c9,t11	148.24±13.94	517.95±13.94	<0.01
C18:4 c6,c9, c12,c15	2.94±1.33	40.96±1.33	<0.01
C20:1	4.94±2.07	14.53±2.07	0.03
C20 :2	3.65±0.46	2.65±0.46	0.20
C20:3 c8,c11,c14	3.30±0.40	1.57±0.40	0.04
C20:4 c5,c8,c11,c14	19.97±0.55	10.62±0.55	0.01
C20:3 c11,c14,c17	17.74±6.39	16.82±6.39	0.92
C20:5 c5,c8,c11,c14,c17	7.86±0.68	11.72±0.68	0.01
C24:0	12.98±1.56	9.17±1.56	0.16
C24:1	3.09±1.35	2.03±1.35	0.61
C22:6 c4,c7,c10,c13,c16,c19	6.45±2.45	6.37±2.45	0.98

Inoltre, sono stati individuati anche altri effetti positivi delle HDL nei confronti delle funzioni vascolari, in quanto esse proteggono le LDL dall'ossidazione, riducono la risposta cellulare alle LDL ossidate e riducono la produzione di fattori piastrino-aggreganti, mentre favoriscono la sintesi di prostaciclina (un potente antagonista dell'aggregazione piastrinica).

L'acido grasso più rappresentativo tra i MUFA è l'OA (C18:1*cis*9), ed è proprio a questo FA che si riferiscono la maggior parte degli studi condotti circa l'interazione tra acidi grassi monoinsaturi e salute dell'uomo, ciò anche in funzione del fatto che l'OA è l'acido grasso maggior presente nella dieta mediterranea.

Il ruolo protettivo degli acidi insaturi in generale e dell'acido oleico in particolare nei confronti delle CHD, è da mettere in relazione al mantenimento dell'integrità funzionale delle membrane cellulari. In effetti, una maggiore insaturazione delle membrane cellulari porta ad un incremento della loro fluidità con conseguente aumento del metabolismo cellulare e, inoltre, ad un aumento del tasso di divisione cellulare. E' anche vero che non sempre un aumento della funzionalità cellulare nel senso sopra descritto è da ritenersi positivo: nel caso di patologie tumorali in atto, la proliferazione cellulare è senz'altro da evitare (Ackman, 1999). Come evidenziato precedentemente, l'oleico è uno tra i pochi acidi per cui la dieta non si è dimostrata un significativo fattore di variazione. Il formaggio non fa eccezione, tanto che il contenuto in OA del pecorino L non è risultato diverso da quello del pecorino C, anche se i due valori sono molto vicini alla significatività statistica (3.29g/100g FTQ in C vs 3.90g/100g FTP in L,  $P=0.07$ ) (Tabella 9.4a).

Il formaggio L è risultato, inoltre, molto più ricco in acidi grassi *trans* rispetto a quello del gruppo di controllo. Ciò a dire che 100 g di formaggio L apportano circa 1.1g di TFA, ossia una quantità circa doppia rispetto a quella apportata da una pari quantità di formaggio C. Come ampiamente illustrato nell'introduzione, numerosi studi, anche recenti, hanno messo in evidenza la correlazione che esiste tra TFA e CHD. Tale associazione può essere interpretata con il fatto che la configurazione "angolare" *trans* fa "rassomigliare" tali acidi a

quelli saturi e che l'assorbimento e la digestione dei *trans* FA avviene nella medesima maniera degli acidi grassi con configurazione *cis*.

Inoltre, gli isomeri *trans* entrano in competizione con il sistema enzimatico responsabile della produzione dei PUFA n-3 ed n-6 a partire dagli EFA determinandone una riduzione, e possono aumentare la concentrazione ematica del colesterolo.

Tuttavia, in merito ai TFA occorre fare un distinguo tra i diversi isomeri. La letteratura non attribuisce a tutti i TFA gli effetti negativi sopra esposti; ad esempio all'acido VA non si attribuiscono effetti negativi sulla salute dell'uomo (Collomb et al., 2006). Dalla tabella 9.4a si nota che, in effetti, l'aumento dei TFA è da attribuirsi soprattutto al VA che nel formaggio C rappresenta circa il 50% sul totale dei TFA, mentre nel formaggio L sale al 62%. Ciò unitamente a quanto esposto poc'anzi, rappresenta un ulteriore miglioramento dalla qualità nutrizionale del formaggio. Infatti, al VA non solo non vengono attribuiti affetti negativi, ma, addirittura, esso sembra svolgere un ruolo positivo in quanto precursore del RA a livello dei tessuti (Collomb et al., 2006).

Da quest'ultimo punto di vista 100g di formaggio L apportano oltre mezzo grammo di RA, ossia una quantità oltre quattro volte superiore alla quantità apportata da una pari quantità di formaggio C.

Gli effetti positivi dei CLA sulla salute dell'uomo sono molteplici. In effetti, numerosi studi hanno evidenziato che i CLA sono efficaci nell'inibire negli animali da laboratorio la carcinogenesi, e l'aterosclerosi ed agiscono positivamente anche in relazione alla risposta immunitaria (Collomb et al., 2006).

Il meccanismo attraverso il quale i CLA estrinsecano la propria azione, ad oggi, non è ben chiaro. Probabilmente la configurazione geometrica dei metaboliti dei CLA e tra questi soprattutto quelli derivati da un processo di elongazione, come il C20:4 coniugato, potrebbero avere un ruolo molto importante nella modulazione della sintesi degli eicosanoidi (Banni et al., 1999). La modulazione del metabolismo degli eicosanoidi sembrerebbe poter fornire una spiegazione dell'influenza positiva esercitata dai CLA sulla degradazione delle proteine muscolari associato alla risposta immunitaria. Tale meccanismo di modulazione

potrebbe, inoltre, essere utilizzato per fornire un'interpretazione dell'influenza dei CLA sulle CHD, in quanto tra gli eicosanoidi esistono delle sostanze (come il Trombossano A<sub>2</sub>) che hanno un potere fortemente proaggregante.

Il potere anticancerogeno dei CLA è da mettere, invece, in relazione ad una protezione nei confronti dell'ossidazione. In questo senso, Farquharson et al. riportano che i CLA sono dei potenti modulatori dell'espressione genica con produzione di fattori che incrementano l'attività degli enzimi redox, in grado di conferire una certa protezione contro il danno cellulare da radicali liberi.

In considerazione dei suddetti effetti positivi dei CLA nei confronti della salute umana si può affermare che gli alimenti che ne sono ricchi sono classificabili come funzionali nei confronti delle CHD, di alcuni tipi di tumore e nell'ambito degli effetti negativi connessi con la risposta immunitaria. Il livello ottimale di tale classe di FA nella dieta per l'uomo non è stato ancora ben stabilito. Da studi su animali si ritiene che questo possa variare da 0.95 g a 3.5 g/d (Collomb et al., 2006).

I PUFA a lunga catena delle serie n-3 ed n-6 più significativi dal punto di vista nutrizionale sono, rispettivamente, gli acidi eicosapentaenoico 20:5 n<sub>3</sub> (EPA) e docososaenoico C 22:6 n<sub>3</sub> (DHA) e l'AA C20:4 n-6. L'importanza nei confronti della nutrizione dell'uomo risiede nel fatto che tali acidi, pur non essendo essenziali in senso stretto, in quanto l'uomo possiede le vie metaboliche atti a formarli, lo diventano di fatto, in quanto esse sono poco efficienti e non garantiscono all'organismo gli apporti adeguati.

Gli acidi grassi polinsaturi della serie n-3 ed n-6 svolgono due importanti funzioni: i) sono coinvolti nei meccanismi di regolazione delle strutture cellulari di tutte le cellule dell'organismo ed in particolar modo di quelle del cervello, della retina e dell'apparato riproduttivo; ii) attraverso reazioni catalizzate dagli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi generano sostanze ad azione ormone-simile come i trombossani, i leucotrieni e le prostaglandine. Queste ultime, in particolare, sono molecole importanti con diverse funzioni che vanno dalla contrazione al rilassamento della muscolatura liscia, al controllo della chemiotassi ed alla modulazione delle citochine. I trombossani del gruppo 2 si dimostrano fortemente

proaggreganti e, quindi, assumo un ruolo decisamente negativo nei confronti delle CHD. I trombossani del gruppo 2 si originano dall'AA che, pertanto, sotto questo aspetto ha un'influenza decisamente negativa nei confronti della salute dell'uomo (Dyerberg, 1992; Cocchi, 1999).

I PUFA n-3 hanno dimostrato proprietà anti aterogeniche, anti trombotiche ed anti infiammatorie. I meccanismi con i quali gli acidi grassi della serie n-3 esplicano tali importanti funzioni sono molteplici e verosimilmente contribuiscono in maniera sinergica all'effetto finale (Dyerberg, 1992).

Nordoy (1992) riporta che in soggetti sottoposti a regimi alimentari che prevedevano diete arricchite in n-3 si sono registrati un calo significativo della colesterolemia VLDL e dei trigliceridi e, a tale diminuzione, non ha fatto riscontro un decremento delle HDL e delle LDL.

L'azione protettiva degli acidi grassi n-3 nei confronti delle CHD su base aterosclerotica, si esplica nei confronti dell'interazione tra le piastrine e le pareti cellulari dei vasi. Ciò è dimostrato dal fatto che gli n-3 consentono di prolungare il tempo di sanguinamento (De Caterina, 1992). Un'interpretazione dell'azione antiaggregante degli n-3 può essere ritrovata nel meccanismo di sostituzione dei substrati per gli enzimi ciclossigenasi e lipossigenasi. L'EPA (Acido Eicosapentaenoico, C20:5*cis*17,*cis*14,*cis*11,*cis*8,*cis*5), infatti, sostituendosi all'AA, modifica la direzione del flusso della produzione degli eicosanoidi. Normalmente questo flusso è indirizzato verso la produzione degli eicosanoidi del gruppo 2 (tra cui il TXA<sub>2</sub>, fattore fortemente proaggregante), mentre, dopo tale sostituzione, vengono privilegiati quelli del gruppo 3, la cui azione è dovuta al potere antiaggregante. Tale teoria non contribuisce, tuttavia, a spiegare per intero l'effetto protettivo degli n-3. Un'altra interpretazione della loro influenza sulle CHD può essere trovata nel fatto che tali acidi favoriscono la sintesi dell'ossido nitrico, che influenza sia la funzionalità piastrinica, sia quella di vasodilatazione (De Caterina, 1992).

La formazione di una placca ateromatosa è un processo complesso che implica l'interazione della parete vascolare non solo con fattori plasmatici quali le lipoproteine, ma anche con diversi elementi cellulari quali le piastrine ed i



leucociti. Gli n-3 si sono dimostrati efficaci nel ridurre o inibire la formazione di lesioni a livello dei vasi sanguigni, probabilmente grazie alle proprietà anti infiammatorie sui componenti delle lesioni stesse. Inoltre, gli n-3 agiscono sia sulle cellule ematiche in circolo, che su quelle della parete vascolare e riducono l'adesività dei neutrofili alle cellule endoteliali (Weksler, 1992).

Nonostante le riconosciute positive influenze nei confronti delle CHD degli acidi polinsaturi a lunga catena n-3, (EPA e DHA), in alcune popolazioni è stato visto che questi aumentano il livello plasmatico del colesterolo LDL. Per questo motivo gli alimenti contenenti grandi quantità di questi due acidi non possono, quindi, essere definiti come funzionali nei confronti delle CHD. Tuttavia, gli acidi grassi polinsaturi della serie n-3 si sono dimostrati efficaci nel ridurre la pressione sanguigna nei soggetti ipertesi e, pertanto, gli alimenti arricchiti in n-3 possono essere considerati funzionali in tal senso (Hornstra, 1999)

Detto ciò, è bene sottolineare che anche dal punto di vista degli apporti di PUFA n-3 il formaggio prodotto con latte derivato da soggetti alimentati con lino estruso si è dimostrato migliore, rispetto al formaggio prodotto da latte dei soggetti del gruppo controllo. Infatti, 100g di formaggio L apportano 495.90 mg di PUFA n-3, mentre 100g di formaggio C solo 125.93 mg (Tabella 9.4b). Tale differenza è in gran parte dovuta all'acido linolenico (85.79 mg/100g FTQ C vs 415.77 mg/100g FTQ L), come risulta dalla tabella 10.1a, ma anche la quantità di EPA è risultata essere nettamente maggiore nel formaggio L (7.86 mg/100g di FTQ in C vs 11.72 mg/100g di FTQ in L). La quantità di DHA, invece, non è risultata statisticamente differente tra i due tipi di formaggio (6.45 mg/100g di FTQ C vs 6.37 mg/100g FTQ L) (tabella 9.4b).

Se è vero che, relativamente ai PUFA n-6 le due tipologie di formaggio non mostrano differenze negli apporti (427.40 mg/100g FTQ C vs 446.51 mg/100g FTQ L,  $P=0.55$ ) (Tabella 9.4a), non si può trascurare il fatto che ciò dipende essenzialmente dal contenuto di acido linoleico (395.45 mg/100g FTQ in C vs 426.12 mg/100g FTQ in L) (Tabella 9.4b), e che, invece, 100 g di formaggio L apportano una quantità di AA pari a circa la metà di quella apportata da un'eguale quantità di formaggio C (tabella 10.1a). In considerazione del ruolo non sempre

positivo nei confronti della salute dell'uomo esercitato dall'AA, questo costituisce un'ulteriore nota di merito del il formaggio L.

Tabella 10.1b – Classi di acidi grassi, contenuto in colesterolo e TBARs nel pecorino ottenuto dalle 2 diverse tesi alimentari

Parametri	Gruppo C	Gruppo L	P
SFA	9215.68±300.03	8182.50±300.03	0.07
MUFA	4251.41±233.78	6320.76±233.78	0.01
TFA	569.47±42.01	1873.94±42.01	<0.01
PUFA n6	427.40±20.62	446.51±20.62	0.55
PUFA n3	125.93±24.21	495.90±24.21	0.01
P/S	0.06±0.01	0.11±0.01	0.01
P/S2	0.07±0.01	0.16±0.01	0.01
PUFA n6/PUFA n3	3.90±0.73	0.90±0.73	0.04
Colesterolo totale	41.70±1.12	41.27±1.12	0.80
TBARs (MDA)	0.02±0.01	0.32±0.01	<0.01
SFA: Acidi Grassi Saturi; MUFA: Acidi Grassi Monoinsaturi; PUFA: Acidi Grassi Polinsaturi; BCFA: Acidi Grassi a Catena Ramificata; OCFA: Acidi Grassi a Catena Dispari; TFA: Acidi Grassi <i>Trans</i> . P/S, PUFA/SFA; P/S2, PUFA/(SFA-C18:0). TBARS, Sostanze Reattive all'Acido Tiobarbiturico; MDA, Malonaldeide			

La migliore qualità nutrizionale del formaggio L rispetto al C in relazione ai PUFA, è confermata anche dal rapporto n6/n3. Come ricordato in precedenza, il consumo di acidi grassi polinsaturi, solo in prima approssimazione può essere considerato un aspetto positivo relativamente alla salute dell'uomo, infatti, i PUFA appartenenti alla serie n-6 non sempre mostrano delle proprietà benefiche. Si rende pertanto necessario un indice con il quale si possa valutare questo diverso comportamento ed è, evidente, che un elevato valore di tale indice è da considerarsi sfavorevole e viceversa. In questo senso, si prende a riferimento il rapporto esistente tra n-6 ed n-3. Relativamente a questo aspetto, si ricorda che il Departement of Health (1994) indica come 4 il valore al di sopra del quale si può incorrere in un maggior rischio di insorgenza di malattie cardiovascolari, ma il valore comunque ottimale sarebbe di 1. Come si vede in tabella 8.4b, il rapporto n6/n3 nel formaggio L rimane nettamente al di sotto del valore indicato dalle linee guida per una corretta alimentazione ed addirittura raggiunge il valore ottimale,

mentre il formaggio C si attesta poco al di sotto del valore soglia. Il miglioramento di tale indice conseguito nel formaggio L è sicuramente un aspetto importante, anche se tuttavia non si può trascurare che su tale modificazione insiste molto l'acido linolenico.

Nella tabella 8.4b sono proposti per la valutazione della qualità nutrizionale del formaggio anche altri due indici: P/S e P/S2. Tali indici rappresentano il rapporto tra i PUFA ed i SFA (P/S) e tra i PUFA ed i SFA – C18:0 (P/S2). È noto, infatti, che i PUFA hanno proprietà, in linea di massima, positive nei confronti della salute dell'uomo, fermi restando i distinguo esposti poc'anzi. Gli SFA, viceversa, predispongono l'insorgenza di alcune patologie a danno del sistema cardiovascolare. Tuttavia, anche per i SFA occorre fare dei distinguo, in quanto, come illustrato, non esistono evidenze sperimentali che associno l'acido stearico (C18:0), uno dei saturi maggiormente rappresentati nei lipidi intramuscolari della carne, all'aumento del rischio di patologie a carico dell'apparato cardiocircolatorio (CHD). L'acido stearico, a livello dei tessuti è, infatti, convertito in acido oleico. Per tale motivo il secondo dei due indici proposti è quello che fornisce una valutazione più corretta da questo punto di vista. Il Departement of Health (1994) indica in 0.45 il valore al di sotto del quale aumenta il rischio di CHD.

Anche da questo punto di vista il formaggio L si dimostra migliore rispetto al pecorino C, evidenziando valori di entrambi gli indici decisamente più favorevoli (quasi il doppio il P/S e più del doppio il P/S2). Ciò nonostante, non si può trascurare che, in termini assoluti, gli indici considerati per entrambe le tipologie di formaggio rimangono al di sotto del livello ottimale raccomandato, così come atteso in relazione alle caratteristiche peculiari del prodotto analizzato.

Nella tabella 10.1b è, inoltre, riportato il contenuto di colesterolo totale espresso nella medesima unità di misura degli acidi grassi (mg/100g FTQ). Come si nota, il contenuto di colesterolo è risultato identico tra le due tipologie di formaggio e, in senso assoluto, si pone in linea con i valori tipici dei formaggi freschi.

Come è stato rimarcato più volte in precedenza, l'inclusione del lino estruso nella dieta delle pecore ha determinato un netto miglioramento delle caratteristiche nutrizionali del formaggio. Tale miglioramento si traduce in un aumento della componente insatura e polinsatura, ed in una diminuzione di quella satura. Ciò se da un lato costituisce un sicuro punto di forza del prodotto arricchito, dall'altro potrebbe renderlo maggiormente sensibile all'ossidazione. Al fine di sondare quest'aspetto, così strettamente correlato con lo stato di salubrità del prodotto al consumo, è stato saggiato il livello di ossidazione degli acidi grassi, attraverso la quantificazione dei prodotti secondari di questo processo. In particolare, è stato misurato il valore della malonaldeide (MDA) che, come è noto, è tra i più rappresentati prodotti secondari dell'ossidazione degli acidi grassi e per questo è convenientemente utilizzata come indicatore del loro stato di ossidazione. Come si nota dalla tabella 8.4b, il formaggio L mostra un livello di ossidazione degli acidi grassi nettamente superiore a quello del formaggio C, tuttavia tale valore di TBARs (Sostanze Reattive all'Acido Tiobarbiturico), rimane assolutamente tollerabile e decisamente entro i limiti di rancidità indicati da Watts (1962) in 1-2 mg di malonaldeide/100 g di prodotto.

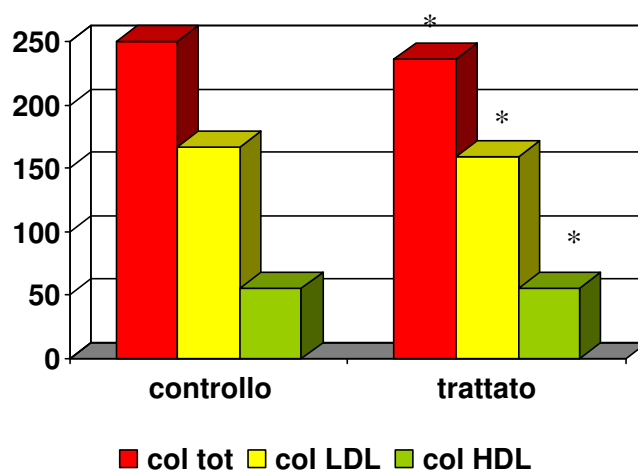
## **12 EFFETTI DELLA ASSUNZIONE DI FORMAGGIO ARRICCHITO NELL'UOMO**

Il formaggio ottenuto dalla sperimentazione, le cui caratteristiche sono state descritte nei paragrafi precedenti, è stato utilizzato per la realizzazione di uno studio su soggetti ipercolesterolemici. La prova aveva la finalità di verificare gli effetti dell'assunzione di formaggio arricchito sul profilo lipidico del plasma, nell'uomo. Lo studio è stato eseguito dal gruppo di ricerca del professor Sebastiano Banni dell'Università di Cagliari, in collaborazione con il dottor Stefano Pintus del Centro di Malattie dismetaboliche dell'Azienda Ospedaliera Brotzu di Cagliari diretto dal dottor Paolo Pintus, con il gruppo di ricerca della

dottressa Batetta del dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche, e del professor Vona del dipartimento di Biologia sperimentale dell'Università di Cagliari.

Il formaggio arricchito è stato distribuito a soggetti leggermente ipercolesterolemici (valori da 230 a 280 mg/dl, i valori fisiologici non devono superare i 200 mg/dl) e sovrappeso. Ogni sperimentazione ha previsto la partecipazione di 20 soggetti, e dopo 3 settimane di assunzione giornaliera di 90 grammi di formaggio arricchito naturalmente in CLA i pazienti mostravano una diminuzione significativa del colesterolo-LDL (quello dannoso) di circa il 10%.

Figura 9.1 - Profilo colesterolemico nei soggetti dopo l'assunzione di 90g/d di formaggio arricchito in CLA e di formaggio controllo.



I risultati preliminari della sperimentazione, che prevede anche la somministrazione di 45 g di formaggio arricchito e non, hanno evidenziato che la colesterolemia non varia. E' attualmente in corso un'ulteriore sperimentazione per valutare gli effetti dell'ingestione di 90 g di formaggio non arricchito sui valori colesterolemici. In generale durante i trattamenti col formaggio arricchito il peso corporeo dei soggetti non è mai variato in maniera significativa. In ogni caso è interessante notare che la diminuzione del colesterolo LDL è correlata all'aumento dei livelli plasmatici di CLA dei pazienti, suggerendo che

quest'ultimo potrebbe essere la molecola direttamente coinvolta. Infine, bisogna sottolineare che questi risultati sono stati ottenuti a seguito della somministrazione di formaggio in aggiunta al normale regime alimentare dei soggetti e non in sostituzione di altri alimenti. Questi risultati mettono in evidenza che il formaggio di pecora, quando ottenuto da latte prodotto con opportuni sistemi di allevamento, non solo non induce aumento della colesterolemia, ma può contribuire ad abbassarla e, pertanto, può essere convenientemente introdotto nella dieta di soggetti ipercolesterolemici.

# Conclusioni

---

L'inclusione del lino estruso nella dieta di pecore da latte ha determinato sensibili modificazioni della composizione acidica della materia prima. In effetti, si è assistito ad una importante diminuzione degli acidi grassi saturi, e, tra questi, in particolar modo del laurico, miristico ed del palmitico, mentre lo stearico è aumentato. Tale aspetto rappresenta un punto di pregio in termini di caratteristiche nutrizionali del prodotto, in funzione del fatto che l'acido miristico è direttamente correlato con l'incremento del rischio d'insorgenza delle CHD, mentre all'acido stearico è attribuito, in questo senso, un comportamento, per così dire, neutro. L'integrazione a base di lino, inoltre, ha comportato una crescita degli acidi grassi monoinsaturi. In questo senso, però, non si è assistito ad una crescita dell'acido oleico, quanto piuttosto a quella dei monoinsaturi *trans* per i quali, numerosi studi, hanno evidenziato una correlazione con alcune patologie cardiovascolari. Tuttavia, è da notare che la dieta L ha comportato una crescita prevalente del *trans* monoinsaturo VA, al quale non solo non vengono riconosciuti effetti negativi, ma addirittura si attribuiscono caratteristiche positive, correlate in particolar modo al suo status di precursore a livello tissutale del CLA RA. In effetti, i dati sperimentali hanno permesso di evidenziare che la dieta L ha fatto assistere ad un incremento del RA, correlata, senza dubbio, proprio al contestuale incremento di acido vaccenico.

La dieta con lino, inoltre, così come atteso, ha incrementato la quantità di acidi grassi polinsaturi della serie n-3, questo ovviamente proprio a causa del tipo di integrazione alimentare particolarmente ricca di acido  $\alpha$ -linolenico. Gli acidi grassi polinsaturi della serie n-6, invece, non hanno subito l'effetto dieta, tranne nel caso dell'acido arachidonico che è diminuito nel latte dei soggetti alimentati con la razione contenente lino.

Le caratteristiche tecnologiche del latte non sono risultate diverse tra le due diete, ed anzi il parametro  $r$ , che esprime in minuti il tempo necessario per l'inizio

della coagulazione, è risultato essere migliore nel latte L. Ciò a dire, che il tipo di integrazione lipidica effettuata non ha arrecato nessun detrimento delle proprietà tecnologiche della materia prima, facendone salvo il carattere particolarmente vocato alla trasformazione casearia.

Per quel che concerne il processo di caseificazione non ha determinato il trasferimento selettivo di nessun acido grasso nel formaggio prodotto con il latte di in entrambe le diete. Ciò indica che i miglioramenti della qualità nutrizionale del latte, ottenuti con la razione L, si sono estesi interamente anche al formaggio. Quest'ultimo aspetto è di fondamentale importanza in considerazione del fatto che la quasi totalità del latte ovino viene destinato alla caseificazione.

Inoltre, la dieta non ha influenzato il contenuto di colesterolo totale del formaggio che è risultato pressoché identico nelle 2 diverse tesi e del tutto in linea con i valori medi relativi a questa tipologia di prodotto.

In conclusione, sembra possibile affermare che la grassatura della dieta di pecore da latte con lino estruso produca un miglioramento, sotto il punto di vista nutrizionale, sia della materia prima che dei prodotti da essa derivati. Tale miglioramento è sicuramente da correlare con la modificazione acidica della frazione lipidica che vede incrementare la componente insatura e polinsatura e diminuire quella satura. Questo aspetto si confà perfettamente con le linee guida in merito alla corretta alimentazione umana, relativamente all'assunzione di sostanze in grado di scongiurare l'insorgenza, in particolar modo, delle patologie a carico del sistema cardio-vascolare.

Ciò nonostante, l'incremento della componente insatura del pecorino potrebbe porsi come fattore di rischio correlato alla maggiore sensibilità del prodotto all'ossidazione. In effetti, dalle evidenze sperimentali è risultato che il formaggio L ha un livello di ossidazione degli acidi grassi nettamente superiore, a quello riscontrato per il formaggio C. Tuttavia, tale valore si è mostrato essere assolutamente tollerabile, non costituire un fattore di rischio per la salute del consumatore e rimanere ampiamente entro i limiti di rancidità. È innegabile, d'altronde, che questo punto si pone come l'elemento di eventuale criticità della tecnica di razionamento sperimentata e che, quindi, potrebbe essere



verosimilmente oggetto di ulteriori indagini ed approfondimenti, ad esempio, relativi al trend ossidativo registrabile nel corso della shelf life del pecorino.

# Bibliografia citata e di riferimento

---

- Ackman R.G. (1999) - Conjugated linoleic acid (CLA) in lipids of fish tissues. In advances in conjugated linoleic acid research, vol. 1. Yurawecz M.P., Mossoba M.M., Kramer J.K.G., Pariza M.W., Nelson G.J., 1999. AOCS press, Champagn, Illinois. pp 283-295.
- Addis M., Cabiddu A., Pinna G., Decandia M., Piredda G., Pirisi A., Molle G., 2005 - Milk and cheese fatty acid composition in sheep fed mediterranean forages with reference to conjugated linoleic acid *cis*-9,*trans*-11. Journal Dairy Science. 88, 3443-3454
- Ahkong Q.F., Fisher D., Tampion W., Lucy J.A., 1975 - Mechanism of cell fusion. Nature 253: 194-195.
- Alasnier C., Remington H., Gandemer G., 1996 - Lipid characteristics associated with oxidative and glycolytic fibres in rabbit muscles . Meat Science 43, 213-224.
- Alonso L., Fontecha J., Lozada L., Fraga M.J., Juarez M., 1999 - Fatty acid composition of caprine milk: major, branched - chain and *trans* fatty acids. J. Dairy Sci. 82: 878-884.
- Antongiovanni M., Buccioni A., Mele M., 2002 - Strategie nutrizionali per il miglioramento della frazione lipidica del latte e della carne. Giornata di studio su "Latte e carne dei ruminanti: componente lipidica e salute umana". 6/3/2002 Firenze. Atti Accademia dei Georgofili.
- Antongiovanni M., Secchiari P., Mele M., Buccioni A., Serra A., Ferruzzi G., Rapaccini S., Pistoia A., 2002. Olive oil calcium soaps and rumen protected methionine in the diet of lactating ewes: milk quality. Ital. J. Anim. Sci. 1, 55-63.

- Baldwin R.L., Smith N.E., Taylor J, and Sharp M., 1980. Manipulating metabolic parameters to improve growth rate and milk secretion. *J.Anim. Sci*, 51: 1416
- Banni S. Angioni E., Carta G., Melis M.P., Murru M.E., Scanu P., Dessi M.A., Vargiolu S., Corongiu F.P., 2001 - Modulazione del metabolismo lipidico e dei livelli di vitamina A tramite alimenti arricchiti in acido linoleico coniugato. *Progress in Nutrition* 3(2): 64-66.
- Banni S. Angioni S., Carta G., Casu V., Murru M.E., Melis M.P., Dessi M.A., Vargiolu S., Corongiu F.P., 1999 - Modificazioni nel metabolismo lipidico indotte dall'apporto alimentare dell'acido linoleico a dieni coniugati (CLA) in relazione alla sua attività anti-cancerogena. *Progress in Nutrition* 1(3-4): 38-48.
- Banni S., Angioni E., Carta G., Melis M.P., Murru E., 2002 - Apporto alimentare di CLA e valutazione degli effetti della loro attività biologica in modelli animali e nell'uomo. Giornata di studio su "Latte e carne dei ruminanti: componente lipidica e salute umana". 6/3/2002 Firenze. Atti Accademia dei Georgofili.
- Banni S., Angioni e., Carta G., Murru E., Spada S., Melis M.P., 2001 - Lipid metabolism modulation by dietary CLA. *Proceeding of 1<sup>st</sup> International Conference on Conjugated Linoleic Acid*. June 10-13, Alesund-Norway. 22.
- Barber M.C., Clegg R.A., Travers M.T., Vernon R.G., 1997 - Lipid metabolism in the lactating mammary gland. *Bioch. Bioph. Acta*. 1347: 101-126.
- Bas P., Sauvant D., 2001 - Variations de la composition des depots lipidiques chez les bovins. *INRA Prod. Anim*. 14(5): 311-322.
- Basu S., Smedman A., Vessby B., 2000 - Conjugated linoleic acid induces lipid peroxidation in humans. *FEBS Lett*. 468: 33.
- Bauchart D, Legay-Carmier F, Doreau M, Gaillard B., 1990. - Lipid metabolism of liquid-associated and solid-adherent bacteria in rumen

- contents of dairy cows offered lipid-supplemented diets. *Br. J. Nutr.* 63(3):563-78.
- Bauchart D., 1993 - Lipid absorption and *transport* in ruminants. *J. Dairy Sci.* 76: 3864.
  - Bauer H., 1972 - Ultrastructural observations on the milk fat globule envelope of cow's milk. *J. Dairy Science* 55: 1375-1387.
  - Bauman D.E., Griinari J.M., 2001 - Regulation and nutritional manipulation of milk fat: low-fat milk syndrome. *Livestock Prod. Sci.* 70(12):15–29.
  - Bauman D.E., Lock A.L., Corl B.A., Ip C., Salter A.M., Parodi P.W., 2006. Milk fatty acids and human health: potential role of conjugated linoleic acid and *trans* fatty acids. In *Ruminant Physiology*, Sejersen, K., Hvelplund, T., Nielsen, M.O. ed. Wageningen Academic Publishers, 535
  - Baumgard L.H., Corl B.A., Dwyer D.A, Saebo A., Bauman D.E., 2000. - Identification of the conjugated linoleic acid isomer that inhibits milk fat synthesis. *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.*, 278: R179-R184
  - Belyea R.L., Adams M.W., 1990 - Energy and nitrogen utilization of high vs. low producing dairy cows. *J. Dairy Sci.* 73: 1023-1031.
  - Berian, M.J., Purroy, A., Teacher, T., Bas, P., 2000 - Effect of animal and nutrition factors and nutrition on lamb meat quality. *In: Ledin, I. (ed.), Morand-Fehr, P. (ed.). Sheep and goat nutrition: intake, digestion, quality of products and rangelands.* Zaragoza – Spain
  - Bernard L., Leroux C., Chilliard Y., 2006 - Characterisation and nutritional regulation of the main lipogenic genes in the ruminant mammary gland. *In: Ruminant physiology, Sejersen, K., Hvelplund, T., Nielsen, M.O. (ed.) Wageningen Academic Publisher, The-Netherlands*, pp. 295-318.
  - Bernard L., Leroux C., Hayes H., Gautier M., Chilliard Y., Martin P., 2001 - Characterization of the caprine stearoyl-CoA desaturase gene and its

mRNA showing an unusually long 3'-UTR sequence arising from a single exon. *Gene*. 281: 53-61.

- Bitman J., Wood D.L., 1990 - Changes in milk fat phospholipids during lactation. *J. Dairy Sci.* 73: 1208-1216.
- Bloch K., 1965 - The biological synthesis of cholesterol. *Science* 150, 19-28.
- Bloch K., 1979 - Speculation on the evolution of sterol structure and function. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 7, 1-5.
- Bloch K., 1983. - Sterol structure and membrane function. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 14, 47-92.
- Bloch K., 1987. - Summing up. *Annu. Rev. Biochem.* 56, 1-19.
- Bocquier, F., Caja, G., 2001. Production et composition du lait de brebis: effets de l'alimentation. *Prod. Anim.* 14: 129-140.
- Boggs D.L, Bergen W.G., Hawkins D.R., 1987. Effects of tallow supplementation and protein withdrawal on ruminal fermentation, microbial synthesis and site of digestion. *J. Anim. Sci*, 64: 970-979.
- Bracco U., Hidalgo J., Bohren H., 1972. - Lipid composition of the fat globule membrane of human and bovine milk. *J. Dairy Sci.* 55: 165-172.
- Brooks C.C., Garner G.B., Gehrke C.W., Muhrer M.E., Pfander W.H., 1954. The effect of added fat on the digestion of cellulose and protein by ovine rumen microorganisms. *J. Anim. Sci*, 14: 2109
- Brown M.S., Goldstein J.L., 1976 - Receptor mediated pathway for cholesterol metabolism. *Science* 191, 150-154.
- Brown M.S., Goldstein J.L., 1986. - A receptor mediated pathway for cholesterol metabolism. *Science* 232, 34-47.
- Brown M.S., Goldstein J.L., 1997 - The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of membrane-bound *transcription* factor. *Cell* 89, 331-340.
- Brown-Crowder I.E., Hart S.P., Cameron M., Dsahlu T., Goetsch A.L., 2001. - Effects of dietary tallow level on performance of Alpine does in early lactation. *Small Rum. Res.* 39: 233-241.

- Brunner J.R., 1974. - Physical equilibria in milk: the lipid phase. In: Webb B.H., Johnson A.H., Alford J.A. (Eds.). Fundamentals of dairy chemistry, Avi Publishing Company Inc., Wesport 474-602.
- Bu D. P., Wang J.Q., Dhiman T. R., Liu S. J., 2007 - Effectiveness of oils rich in linoleic acids to enhance conjugated linoleic acid in milk from dairy cows. Journal Dairy Science 90, 998-1007
- Buccioni A., Petacchi F., Antongiovanni M., 2002. - Attività ruminali e presenza di acidi grassi *trans* e di CLA nei lipidi del latte e della carne. Giornata di studio su "Latte e carne dei ruminanti: componente lipidica e salute umana". 6/3/2002 Firenze. Atti Accademia dei Georgofili.
- Caggiula A.W. e Mustad V.A., 1997. - Effects of dietary fat and fatty acids on coronary artery disease risk and total lipoprotein cholesterol concentration: epidemiologic studies. Am. J. Clin. Nutr., 65 (suppl): 1597S-1610S.
- Casals, R.,Caja,G.,Such, X.,Torre,C.,Calsamiglia, S., 1999. - Effects of calcium soaps and rumen undegradable protein on the milk production and composition of dairy ewes. J. Dairy Res. 66: 177-191.
- Chalupa W., Rickabaugh B., Kronfeld D.S., Sklan D., 1984. Rumen fermentation in vitro as influenced by long chain fatty acids. J.Dairy. Sci. 67: 1439.
- Chandan R.C., Cullen J., Chapman D., 1972. - Physicochemical analyses of the bovine milk fat globule membrane. 3. Proton magnetic resonance spectroscopy. J. Dairy Sci. 55: 1232-1236.
- Chilliard Y, Ferlay A, Mansbridge RM, Doreau M., 2000. - Ruminant milk fat plasticity: nutritional control of saturated, polyunsaturated, *trans* and conjugated fatty acids. Annal. Zootech. 49:181–205
- Chilliard Y., Chabosseau J.M., Rouel J., Capitan P., Gominard C., Gaborit P., Juaneda P., Ferlay A., 2002. - Interactions between forage nature and sunflower or linseed oil supplementation on goat milk fatty acids of interest for human nutrition. In: J.L. Durans, J.C. Emile, C. Huyghe, G. Lemaire (Eds.), Multifunction Grasslands: quality forages, animal

products and landscapes. Proceedings of 19<sup>th</sup> General Meeting of the European Grassland Federation. La Rochelle, France. Grassland Science in Europe, 7 : 548-549.

- Chilliard Y., Gagliostro G., Flechet J., Lefaivre J., Sebastian I., 1991. - Duodenal rapeseed oil infusion in early and midlactation cows. 5. Milk fatty acids and adipose tissue lipogenic activities. J. Dairy Sci. 74: 1844-1854.
- Chilliard Y., Lamberet G., 1984. - La lipolyse dans le lait: les différents types, mécanismes, facteurs de variation, signification pratique. Lait 64: 544-578.
- Chilliard, Y., Bocquier, F., 1993. - Effect of fat supplementation on milk yield and composition in dairy goats and ewes. Proc. 5<sup>th</sup> Int. Symp. "La qualità delle produzioni dei piccoli ruminanti". Camera Commercio Industria Artigianato Agricoltura di Varese, Italia, 3 Dicembre 1993 : 61-68.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Doreau, M., 2001. - Effect of different types of forages, animal fat or marine oils in cow's diets on milk fat secretion and composition, especially conjugated linoleic acid (CLA) and polyunsaturated fatty acids. Livest. Prod. Sci. 70: 30-48.
- Chilliard, Y., Ferlay, A., Rouel, J., Lamberet, G., 2003. - A review of nutritional and physiological factors affecting goat milk lipid synthesis and lipolysis. J. Dairy Sci. 86:1751-1770.
- Chilliard, Y., Glasser, F., Ferlay, A., Bernard, L., Rouel, J., Doreau, M. 2007. - Diet, rumen biohydrogenation and nutritional quality of cow and goat milk fat. Eur. J. Lipid Sci. Technol. 109: 828-855.
- Chin S.F., Liu W., Storkson J.M., Ha Y.L., Pariza M.W., 1992. - Dietary sources of conjugated dienoic isomers of linoleic acid, a newly recognized class of anticarcinogens. J. Food Composition and Analysis 5: 185.
- Chizzolini R., Zanardi E., Dorigoni V. e Ghidini S., 1999 - Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat and meat products. Trends in food science and technology 10, 119-128.

- Chouinard P.Y., Girard V., Brisson G.J., 1998. - Fatty acid profile and physical properties of milk fat from cows fed calcium salts of fatty acids with varying unsaturation. J. Dairy Sci. 81: 471-481
- Christie W.W., 1995 - Composition and structure of milk lipids. In: Advanced Dairy Chemistry-2: Lipids. (Ed. P.F. Fox) Chapman and Hall, London, 1-36..
- Christie W.W., Clapperton J.L., 1982 - Structures of cow's milk, fortified milks (including infant formula) and human milk. J. Soc. Dairy Technol. 35: 22.
- Clarke R., Frost C., Collins R., Appleby P., Peto R., 1997 - Dietary lipids and blood cholesterol: quantitative meta-analysis of metabolic ward studies. Br. Med. J. 314, 112-117.
- Cocchi M., 1999. - Acidi grassi polinsaturi e sviluppo perinatale. Progress in nutrition. 1(1): 3-27.
- Collomb M., Schmid A., Sieber R., Wechsler D., Ryhänen E.L., 2006. – Conjugated linoleic acids in milk fat: variation and physiological effects. International Dairy Journal. 16, 1347-1361
- Cook M.E., Pariza M., 1998. - The role of Conjugated Linoleic Acid (CLA) in health. Int. Dairy Journal 8, 459-462.
- Corl B.A., Chouinard P.Y., Bauman D.E., Dwyer D.A., Griinari J.M., Nurmela K.V., 1998. - Conjugated linoleic acid in milk fat of dairy cows originate in part by endogenous synthesis from *trans*-11 octadecenoic acid. J. Dairy Sci. 82: 2737-2745
- Craig-Schmidt M.C.; 1998. - Worldwide consumption of *trans*-fatty acids. Chapter 3 *Trans* fatty acids in human nutrition, pp. 59-114.
- Cunnane S.C., 2000. - The conditional nature of the dietary need for polyunsaturated: a proposal to reclassify "essential fatty acids" as "conditionally-indispensable" or "conditionally-dispensable" fatty acids. Brit. J. Nutr.. 84: 803-812.
- Czerkawski J.W., 1973. - Effect of linseed oil fatty acids and linseed oil on rumen fermentation in sheep. J. Agric. Sci. Camb 81: 517



- Czerkawski J.W., 1984. - Microbial fermentation in the rumen. *Proc. Nutr. Soc.* 43(2):101-18.
- Danthine S., Blecker C., Paquot M., Innocente N., Deroanne C., 2000. - Évolution des connaissances sur la membrane du globule gras du lait: synthèse bibliographique. *Lait*, 80: 209-222.
- De Caterina R., 1992. - Acidi grassi n-3: ed interazioni fra piastrine e parete vascolare. In De Caterina R., Kristensen S.D., Schmidt E.B (Eds.). *Fish Oil e Malattia Vascolare*. Bi & Gi Editori – Verona. 47-53.
- De Peters E.J., German J.B., Taylor S.J., Essex S.T., Perez-Monti H., 2001. - Fatty acid and triglyceride composition of milk fat from lactating Holstein cows in response to supplemental canola oil. *J. dairy Sci.* 84: 929-936.
- De Peters E.J., Medrano J.F., Reed B.A. (1995) - Fatty acid composition of milk fat from three breeds of dairy cattle. *Can. J. Anim. Sci.* 75: 267-269.
- Deeney J.T., Valivullah H.M., Dapper C.H., Dylewski D.P., Keenan T.W., 1985. - Microlipid droplets in milk secreting mammary epithelial cells: evidence that they originate from endoplasmic reticulum and are precursors of milk lipid globules. *Eur. J. Cell. Biol.* 8: 16-26.
- Deeth H., 1997. - The role of phospholipids in the stability of milk fat globules. Australian Food Industry Science Center, Milkfat update conf., 1997.
- Deeth H.C., Fitz-Gerald C.H., 1978. - Effects of mechanical agitation of raw milk on the milk fat globule in relation to the level of induced lipolysis. *J. Dairy Res.* 45: 373-380.
- Destailats F., Trottier J.P., Galvez J.M.G., Angers P., 2005. - Analysis of  $\alpha$ -linolenic acid biohydrogenation intermediates in milk fat with emphasis on conjugated linolenic acids. *Journal Dairy Science*. 88, 3231-3239.
- Devendra C., Lewis D., 1974. - The interaction between dietary lipids and fibre in the sheep. *Anim. Prod* 19: 67

- Dorado M., Matin Gomez E.M., Jimenez-Colmenero F., Masoud T.A., 1999. - Cholesterol and fat contents of spanish commercial pork cuts. Meat Science 51, 321-323.
- Doreau M., Chilliard Y., Bauchart D., Michalet-Doreau B., 1991. Influence of different fat supplements on digestibility and ruminal digestion in cows. Ann. Zootech 40, 19-30
- Downing D.T., 1992. - Lipid and protein structures in the permeability barrier of mammalian epidermis. J. Lipid Res., 33(3): 301-313.
- Dyerberg J., 1992 - Acidi grassi n-3: basi epidemiologiche ed introduzione generale. In De Caterina R., Kristensen S.D., Schmidt E.B (Eds.). Fish Oil e Malattia Vascolare. Bi & Gi Editori – Verona. 3-8.
- Dylewski D.P., Keenan T.W., 1983 - Compound exocytosis of casein micelles in mammary epithelial cells. Eur. J. Cell. Biol. 31: 114-124.
- Edwards P., Tabor D., Kast H.R., Venkateswaran A., 2000. - Regulation of gene expression by SREBP and SCAP. BBA 1529, 103-113.
- Emery R.S., Liesman J.S., Herdt T.H., 1992. - Metabolism of long chain fatty acids by ruminant liver. J.Nutr. 122: 832-837.
- Enser M., Scollan N.D., Choi N.J., Kurt E., Hallet K., Wood J.D., 1999. - Effect of dietary lipid on content of conjugated linoleic acid (CLA) in beef muscle. J. Anim. Sci., 69, 143-146.
- Fay J.P., Jakober K.D., Cheng K.J., Costerton J.W., 1990. - Esterase activity of pure cultures of rumen bacteria as expressed by the hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate. Can. J. Microb. 36: 585.
- Fernandez X., Mourot J., Mounier A., Ecolan P., 1995. - Effect of muscle type and food deprivation for 24 hours on the composition of the lipid fraction in muscle of large white pigs. Meat Science 41, 335-343.
- Fielding C.J., Fielding P.E., 1981. - Evidence for a lipoprotein carrier in human plasma catalyzing sterol efflux from cultured fibroblast and its relationship to lecitin:cholesterol acyltransferase. Proc. Natl. Acad. Sci USA 78, 3911-3914.

- Folch J., Lees M., and Stanley G.H.S. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J. Bioc. Chem.* 226: 497-509
- Forrest G., 1978. - *Chemistry and Physics of Lipids* 21: 237-252.
- Fraga M.J., Fontecha J., Lozada L., Martinez-Castro I., Juarez M., 2000. - Composition of the sterol fraction of caprine milk fat by gas chromatography and mass spectrometry. *J. Dairy Res.* 67: 437-441.
- Franke W.W., Heid H.W., Grund C., Winter S., Freudenstein C., Schurid E., Jarasch E.D., Keenan T.W., 1981. - Antibodies to the major insoluble milk fat globule membrane associated proteins: specific location in apical regions of lactating epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 89: 485-494.
- Franke W.W., Keenan T.W. (1979) - Interaction of secretory vesicle membrane coat structures with membrane free areas of forming milk lipid globules. *J. Dairy Science* 62: 1322-1325.
- Gagliostro G., Chilliard Y., Davicco M.J., 1991. - Duodenal rapeseed oil infusion in early and mid-lactation cows. 3. Plasma hormones and mammary apparent uptake of metabolites. *J. Dairy Sci.* 74: 1893-1903.
- Geay Y., Bauchart D., Hocquette J.F., Culioli J., 2001. - Effect of nutritional factors on biochemical, structural and metabolic characteristics of muscles in ruminants, consequences on dietetic value and sensorial qualities of meat. *Reprod. Nutr. Dev.* 41, 1-26.
- German JB., Morand L., Dillard C.J., Xu R., 1997. - Milk fat composition: targets for alteration of functional and nutrition. *Milk composition, Production and Biotechnology.* Cab international, pp. 35-72.
- Gibson J.P., 1991. - The potential for genetic change in milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 74: 3258-3266.
- Griinari J.M., Bauman, D.E., 1999. - Biosynthesis of conjugated linoleic acid and its incorporation into meat and milk in ruminants. In: M.P. Yurawecz, M.M.Mossoba, J.K. G.Kramer, M.W. Pariza and G.J.Nelson (Ed.) *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, vol 1. Pp. 180-200. AOCS Press, Champaign, IL.

- Griinari J.M., Dwyer D.A, McGuire M.A., Bauman, D.E., Palmquist D.L. Nurmela K.V.V., 1998. - *Trans*-octadecenoic acids and milk fat depression in lactating dairy cows. J. Dairy Sci, 81: 1251-1261
- Grundy S.M. (1994). Principi di medicina interna – pp 1068-1083.
- Gulati, S.K., Byers, E.B., Byers, Y.G., Ashes, J.R., Scott, T.W. 1997. Effect of feeding different fat supplements on the fatty acid composition of goat milk. Anim. Feed Sci. Tech. 66: 159-164.
- Ha J.K., Lindsay R.C., 1991. - Contributions of cow's, shepp's and goat's milks to characterizing branched-chain fatty acids and phenolic flavors in varietal cheeses. J. Dairy Sci. 74: 3267-3274.
- Ha, J.K., Lindsay, R.C., 1993. - Release of volatile branched-chain and other fatty acids from ruminal milk fats by various lipases. J. Dairy Sci. 76: 677-690.
- Hadjipanayiotou M., 1999. - Feeding ensiled crude olive cake to lactating Chios ewes, Damascus goats and Friresian cows. Livest. Prod. Sci. 59: 61-66.
- Hai-Yenia A., Assaf P., Nassar T., Katzhendlern J., 2000. - Determination of lipoic acid and dihidrolipoic acid in human plasma and urine by HPLC with fluorimetric detection. J. Chrom. A, 870 381-388.
- Hamzawi L.F., 1990. - Role of phospholipids and  $\alpha$ -tocoferolo as natural antioxidants in buffalo butterfat. Milchwissenschaft 45 (2): 95-97.
- Harfoot C.G., 1978. Lipid metabolism in the rumen. Prog. Lipid Res. 17: 21-54
- Harfoot C.G., Hazlewood G.P., 1988. - Lipid metabolism in the rumen. In: The Rumen Microbiol Ecosystem ed. P N Hobson. Elsevier, London, 285-322.
- Harfoot C.G., Noble R.C., Moore J.H., 1973. - Factors influencing the extent of biohydrogenation of linoleic acid by rumen microorganism *in vitro*. J. Food Agric. 24: 961.
- Hasler C.M., 1998. - Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. Food Technology; 52(2): 57-62.

- Hegsted D.M., McGandy R.B., Myers M.L., Stare F.J., 1965. - Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am. J. Clin. Nutr.* 55, 1060-1070.
- Heid H.W., Winter S., Bruder G., Keenan T.W., Jarasch E.D. 1983. - Butyrophilin, an apical plasma membrane-associated glycoprotein characteristic of lactating mammary glands of diverse species. *Biochim. Biophys. Acta* 728: 228-238.
- Henderson C., 1973. The effects of fatty acids on pure culture of rumen bacteria. *J. Agric. Sci. Camb.* 81:107
- Hodgson J.M., Wahlqvist M.L., Boxall J.A., Balazs N.D., 1996. - Platelet *trans* fatty acids in relation to angiographically assessed coronary artery disease. *Atherosclerosis*, 120: 147-154.
- Hoelcher L.M., Savell L.W., Smith S.B., Cross H.R., 1988. - Subcellular distribution of cholesterol within muscle and adipose tissues of beef loin steaks. *J. Food Sci.* 53, 718-722
- Hornstra G., 1999. - Lipids in functional foods in relation to cardiovascular disease. *Lipids*, 12, S456-S466.
- Horrobin D.F., Bennett C.N., 1999. - Depression and bipolar disorder: relationships to impaired fatty acid and phospholipid metabolism and to diabetes, cardiovascular disease, immunological abnormalities, cancer, ageing and osteoporosis. Possible candidate genes. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids*, 60(4): 217-234.
- Huang T.C., Kuksis A., 1967. - A comparative study of the lipids of globule membrane and fat core and of the milk serum of cows. *Lipids* 6: 453-460.
- Huggins J.W., Trenbeath T.P., Chesnut R.W., Carraway C.A.C., Carraway K.L., 1980. - Purification of plasma membranes of rat mammary gland: compositions of subfractions with rat milk fat globule membrane. *Exp. Cell. Res.* 126: 279-288.
- Huston G.E., Patton S., 1990. - Factors related to the formation of cytoplasmic crescents on milk fat globule. *J. Dairy Science* 73: 2061-2066.

- Ikwuegbu O.A., Sutton J.D., 1982. - The effect of varying the amount of linseed oil supplementation on rumen metabolism in sheep. *Brit. J. Nutr.* 48: 365-375
- Ip C., Jiang C., Thompson H.J. and Scimeca A.J., 1997. - Retention of conjugated linoleic acid in the mammary gland is associated with tumor inhibition during the post initiation phase of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 18:755-759
- Jahreis G., Fritsche J., Kraft J., 1999. - Species-dependent, seasonal, and dietary variation of conjugated linoleic acid in milk. In *Advances in Conjugated Linoleic Acid Research*, Vol. 1. M.P. Yurawecz, M. M. Mossoba, J. K. G. Kramer, M. W. Pariza, and G. J. Nelson (eds.). Champaign, IL, AOCS Press., 215–225.
- Jakobsen M., Bertelsen G., 2000. - Colour stability and lipids oxidation of fresh beef. Development of a response surface model for predicting the effects of temperature, storage time, and modified atmosphere composition. *Meat Sci.* 54, 49-57.
- Jenkins T.C., 1993. - Lipid metabolism in the rumen. *J. Dairy Sci.* 76: 3851-3863.
- Jenkins T.C., 1994. - Regulation of lipid metabolism in the rumen. *J. Nutr.* 124: 1372S-1376S.
- Jenkins T.C., Palmquist D.L., 1984. - Effect of fatty acids and calcium soaps on rumen and total nutrient digestibility of dairy rations. *J. Dairy Sci.* 67: 978-984.
- Jensen R.G., Ferris A.M., Lammi-Keefe C.J., 1991. - The composition of milk fat. *J. Dairy Sci.* 74: 3228-3243.
- Jesse B.W., Solomon R.K., Baldwin R.L., 1992. - Palmitate metabolism by isolated sheep rumen epithelial cells. *J. Anim. Sci.* 70: 2235-2242.
- Jiang J., Bjoerck L., Fonden R., Emanuelson M., 1996. - Occurrence of conjugated *cis*-9,*trans*-11-octadecadienoic acid in bovine milk -- effects of feed and dietary regimen. *J. Dairy Sci.* 79: 438-445.

- Jiang J., Wolk A., Vessby B., 1999 - Relation between the intake of milk fat and the occurrence of conjugated linoleic acid in human adipose tissue. *Am J. Clin. Nutr.* 70: 21.
- Johnson W.J., Bamberger M.J., Latta R.A., Rapp P.E., Phillips M.C., Rothblat G.H., 1986 - The bi-directional flux of cholesterol between cells and lipoprotein: effects of phospholipids depletion of HDL. *J. Biol. Chem.* 261 5766-5776.
- Johnson W.J., Mahlberg F.H., Chacko G.K., Phillips M.C., Rothblat G.H., 1988. - The influence of cellular and lipoprotein cholesterol contents on the efflux of cholesterol between fibroblasts and HDL. *J. Biol. Chem.* 263 14099-14106.
- Kanno C., 1990. - Secretory membranes of the lactating mammary gland. *Protoplasma* 159: 184-208.
- Kanno C., Hattori H., Yamauchi K., 1982. - Isolation and characterization of plasma membrane from lactating bovine mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* 689: 121-134.
- Kataoka H., 1998. - Chromatographic analysis of lipoic acid and related compounds. *J. Chrom. B.* 717: 247-262.
- Keenan T.W., Dylewski D.P., 1995. - Intracellular origin of milk lipid globules and the nature and structure of the milk lipid globule membrane. In: *Advanced Dairy Chemistry-2: Lipids* (Ed. P.F. Fox) Chapman and Hall, London, 89-130.
- Kelly M.L., Berry J.R., Dwyer D.A., Griinari J.M., Chouinard P.Y., Vanamburgh M.E., Bauman D.E., 1998. *J. Nutr.* 128: 881-885.
- Kepler C.R., Hirons K.I., McNeill P.H., Tove S.B., 1967. - Intermediates and products of biohydrogenation of linoleic acid by *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J. Biol. Chem.* 241: 1350-1354.
- Keys A., Anderson J.T., Grande F., 1965. - Serum cholesterol response to change in the diet IV. Particular saturated fatty acids in the diet. *Metabolism* 14: 776-786.

- Kinsella J.E., 1972. - Stearoyl-CoA as a precursor of oleic acid and glycerolipids in mammary microsomes from lactating bovine: possible regulatory step in milk triglyceride synthesis. *Lipids* 7: 349-355.
- Kitchen B.J., 1977. - Fractionation and characterization of the membranes from bovine milk fat globules. *J. Dairy Res.* 44: 469-482.
- Kitessa, S.M., Gulati, S.K., Ashes, J.R., Fleck, E., Scott, T.W., Nichols, P.D., 2001. Utilisation of fish oil in ruminants II. *Transfer* of fish oil fatty acids into goats' milk. *Anim. Feed Sci. Tech.* 89: 201-208.
- Kohlmeier L., 1997. - Adipose tissue *trans* fatty acids and breast cancer in the European community multicenter study on antioxidant, myocardial infarction and breast cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 6 (9): 705-710.
- Kramer J.K.G., Sehat N., Dugan M.E.R., Mossoba M.M., Yurawecz M., Roach J.A.G., Eulitz K., Aalhus J., Schaefer A., Ku Y., 1998. - Distribution of conjugated linoleic acid (CLA) isomers in tissue lipid classes of pigs fed a commercial CLA mixture determined by gas chromatography and silver ion high performance liquid chromatography. *Lipids* 33: 549-556.
- Kromhout D., Menotti A., Bloemberg B., Aravanis C., Blackburn H., Buzina R., Dontas A.S., Fidanza F., Giampaoli S., Jansen A., 1995. - Dietary saturated and *trans* fatty acids and cholesterol and 25-year mortality from coronary heart disease: the Seven Countries Study. *Prev. Med.* 24: 308-315.
- Lawless F., Murphy J.J., Harrington D., Devery R., Stanton C., 1998. Elevation of Conjugated cis-9, trans-11-Octadecadienoic Acid in Bovine Milk Because of Dietary Supplementation. *J. Dairy Sci.* 81: 3259-3267.
- Lercker G. e Rodriguez-Estrada M.T., 1999. - Acidi grassi polinsaturi negli alimenti: aspetti ossidativi e protezione. *Progress in Nutrition*, 1 (3/4): 66-75.



- Lock A.L., Perfield I.I., Bauman D.E., 2004. *Trans* fatty acids in ruminant-derived foods: fact and fiction. Proc. Cornell nutrition Conf. pp. 123-134.
- Malau-Aduli A.E.O., Edriss M.A., Sieberge B.D., Bottema C.D.K., Pitchford W.S., 2000. - Breed differences and genetic parameters on growth performance, carcass characteristics and fatty acids composition of lot-fed cattle. J. Anim. Sci. 75: 910-919.
- Martin B., Fedele V., Ferlay A., Groleir P., Rock E., Gruffat D., Chilliard Y., 2004. - Effects of grass based diets on the content of micronutrients and fatty acids in bovine and caprine dairy products. In A. Luscher, B. Jeangros, W. Kessler, O Huguenin, M. Lobsiger, N. Millar, D. Suter (Eds.), Land use systems in grassland dominated regions. Proceedings of 20<sup>th</sup> General Meeting of the European Grassland Federation. Luzerne, Switzerland. Grassland Science in Europe, 9 : 876-886.
- Mather I.H., Keenan T.W., 1998. - Origin and secretion of milk lipids. Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia 3, 3: 259-273.
- Mc Pherson A., Kitchen B.J., 1983. - Reviews of the progress of Dairy Science: The bovine milk fat globule membrane-its formation, composition, structure and behaviour in milk and dairy products. J. Dairy Res. 50: 107-133.
- McDonald, I.W., Scott, T.W., 1977. - Food of ruminant origin with elevated content of polyunsaturated fatty acids. World Rev. Nutr. Dietetics. 26: 144-207.
- McGuire M.A., McGuire M.K., 1999. - Conjugated linoleic acid: a ruminant fatty acid with beneficial effects on human health. Proc. American Soc. Anim. Sci. 118.
- McNamara D.J., 2000. - Dietary cholesterol and atherosclerosis. Biochimica et Biophysica Acta 1529: 310-320.
- McNamara D.J., 1997. - Cholesterol intake and plasma cholesterol: an update. J. Am. Coll. Nutr. 16: 530-534

- Mehaia M.A., 1995. - The fat globule size distribution in camel, goat, ewe and cow milk. *Milchwissenschaft*, 50(5): 260-263.
- Mele M., Conte G., Castiglioni B., Chessa S., Macciotta N.P.P., Serra A., Buccioni A., Pagnacco G., Secchiari P., 2007. - Stearoyl-CoA Desaturase Gene Polymorphism and Milk Fatty Acid Composition in Italian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 90:4458–4465.
- Mele M., Serra A., Secchiari P., Ferruzzi G., Pistoia A., Russo C., 2001 - Effect of slaughtering age on CLA isomers content in meat fat of Mucca Pisana calves. Recent progress in animal production science, 2. Proceedings of the ASPA XIV Congress. 108-110.
- Mele M., Serra A., Conte G., Pollicardo A., Del Viva M., Secchiari P. 2007 b. - Whole extruded linseed in the diet of dairy ewes during early lactation: effect on the fatty acid composition of milk and cheese. *Ital. J. Anim. Sci.* 6 (suppl. 1): 560-562.
- Mele M., Serra A., Manzo M., Paoletti F., Secchiari P., 2002. - La sintesi endomammaria di CLA nei ruminanti. Giornata di studio su "Latte e carne dei ruminanti: componente lipidica e salute umana". 6/3/2002 Firenze. Atti Accademia dei Georgofili.
- Mele, M., Buccioni, A., Petacchi, F., Serra, A., Banni, S., Antongiovanni, M., Secchiari, P., 2006. - Effect of forage/concentrate ratio and soybean oil supplementation on milk yield, and composition from Sarda ewes. *Anim. Res.* 55: 273-285.
- Mensink R.P., Zock P.L., Kester A.T.M., Katan M.B., 2003. - Effects of dietary fatty acids and carbohydrates on the ratio of serum total to HDL Cholesterol and on serum lipids and apolipoproteins: a meta-analysis of 60 controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77: 1146-1155.
- Mensink R.P., 2005. - Effects of stearic acid on plasma lipid and lipoproteins in human. *Lipids*, 40: 1201-1205.
- Moore J.H., Christie W.W., 1981. - Lipid metabolism in the mammary gland of ruminant animals. In Christie W.W. (Ed.). *Lipid metabolism in ruminant animals*, Pergamon Press. 227-277.

- Moore J.H., Noble R.C., Steele W., Czerkawski., 1969. - Difference in the metabolism of esterified and unesterified linoleic acid by rumen microorganism. Brit. J. Nutr. 23: 869.
- Morand-Fehr, P. Bas, P., Sauvant, D., Hervieu, Chilliard, Y., 1984a. - Utilisation des matières grasses chez le ruminants. Experiences sur le chèvres laitieres. Pages D1-D21 in CAAAA: Peut-on et comment utiliser le matières grasses dans les rations des vaches laitières. Nov 8, ADEPRINA, Paris, France.
- Morand-Fehr, Sauvant, D., P. Bas, P., 1984b.- Effet de la fraction grasse des graines de soja sur le performances des chèvres laitières. 35<sup>th</sup> Annual meeting of the EAAP. The Hague The Netherlands.
- Mosley, E.E., Powell, G.L., Riley, M.B., Jenkins, T.C., 2002. - Microbial biohydrogenation of oleic acid to *trans* isomers in vitro. J. Lipid Res. 43: 290-296.
- Namboodiri KK, Green PP, Kaplan EB, Morrison JA, Chase GA, Elston RC, Owen AR, Rifkind BM, Glueck CJ, Tyroler HA., 1984. - The Collaborative Lipid Research Clinics Program Family Study. IV. Familial associations of plasma lipids and lipoproteins. Am J Epidemiol., 119(6): 975-96.
- Nielsen L.B., Leth-Espensen P.E.R., Nordestgaard D.G., Foged E., Kjeldsen K., Stender S., 1995. - Replacement of dietary saturated fat with monounsaturated fat: effect on atherogenesis in cholesterol-fed rabbits clamped at the same plasma cholesterol level. British Journal of Nutrition, 74, 509-521.
- Nordoy A., 1992. - What is the clinical evidence for a thrombogenic potential of dietary long-chain fatty acids? Am J Clin Nutr., 56(4 Suppl): 821S-822S.
- Ntambi J.M., 1995. - The regulation of stearoyl-CoA desaturase (SCD). Prog. Lipid Res. 34: 139-150.
- Nudda A., Mele M., Battacone G., Usai M.G., Macciotta N.P.P., 2003. - Comparison of conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of ewes and

- goats with the same dietary regimen. *Ital. J. Anim. Sci. (Suppl. 1)*: 515-517.
- Numberg K., Ender B., Papstein H.J., Wegner J., Ender K., Numberg G., 1999. - Effect of growth and breed on the fatty acid composition of the muscle lipids in cattle. *Z. Lebens. Unters. Forsch. A* 208: 332-335.
  - Oliver M.F., 1991. - Might treatment of hypercholesterolaemia increase non-cardiac mortality? *The Lancet* 337: 1529-1531.
  - Osuna, D.R., Casals, R., Caja, G., Peris, S., 1998. Effect of feeding whole oilseeds to partially replace calcium soap of fatty acids on dairy ewes intake and milk production and composition. *J. Dairy Sci.* 81 (suppl. 1): 302 (abstr.).
  - Palmquist D.L., 1994. - The role of dietary fats in efficiency of ruminants. *J. Nutr.* 124: 1377S-1382S
  - Palmquist D.L., Beaulieu A.D., 1992. - Differences between Jersey and Holstein cows in milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 75(Supl. 1): 292.
  - Palmquist D.L., Beaulieu A.D., Barbano D.M., 1993. - Fed and animal factors influencing milk fat composition. *J. Dairy Sci.* 76: 1753-1771.
  - Palmquist D.L., Davis C.L., Brown E., Sachan D. S., 1969. - Availability and metabolism of various substrates in ruminants. V. Entry rate into the body and incorporation into milk fat of D(-)β-hydroxybutyrate. *J. Dairy Sci.* 52: 633-642.
  - Palmquist D.L., Jenkins T.C., 1980. - Fat in lactation rations: review. *J. Dairy Sci* 63: 1-14.
  - Pariza M.W., Park Y., Cook M.E., 2001. - The biologically active isomers of conjugated linoleic acid. *Prog. Lipid Res.* 40: 283.
  - Parodi P.W., 1989. - Some aspects of milk fat triglyceride structure. In . B.B. Rich (Ed.). *Proceedings of developments in milk fat technology seminar*. Food Res. Inst. Dep. Agric. Rural Affairs, Victoria, Austr. pag. 1.
  - Parodi P.W., 1977. - Conjugated octadecadienoic acids of milk fat. *J. Dairy Sci.* 60: 1550-1553.

- Perez-Alba, L.M., De Souza Cavalcanti, S., Perez Hernandez, M., Martinez Marin, A., Fernandez Marin, G., 1997. - Calcium soap of olive fatty acids in the diet of Manchega dairy ewes: effect on digestibility and production. *J. Dairy Sci.* 80: 3316-3324.
- Pietinen P., Ascherio A., Korhonen P., Hartman A.M., Willet W.C., Albanes D., Virtamo J., 1999. - Intake of fatty acids and risk of coronary heart disease in a cohort of Finnish men- the alpha tocopherol, beta carotene cancer prevention study. *Am. J. Epidemiol.* 145: 876-887.
- Polidori F., 1994. - Il latte dietetico. Atti convegno "Un alimento antico in viaggio verso il futuro. Biotecnologie e produzione del latte." Torino 3-4 novembre 1994.
- Polidori F., Sgoifo Rossi C.A., Senatore E.M., Savoini G., Dell'Orto V., 1997. - Effect of recombinant bovine somatotropin and calcium salts of long-chain fatty acids on milk from italian buffalo. *J. Dairy Sci.* 80: 2137-2142.
- Polidori P., Maggi G.L., Moretti V.M., Valfrè F., 1993. - Caratteristiche dimensionali e composizionali dei globuli di grasso del latte di bovine di razza Frisona Italiana e Bruna. Atti 10° Congr. Naz. ASPA. 241-246.
- Pollard M.R., Gunstone F.D., James A.T., Morris L.J., 1980. - Desaturation of positional and geometric isomers of monoenoic fatty acids by microsomal preparations from rat liver. *Lipids* 15: 306-314.
- Precht D., Molkentin J., Destailats F., Wolff R.L., 2001. - Comparative studies on individual isomeric 18:1 acids in cow, goat and ewe milk fats by low temperature high resolution capillary gas-liquid chromatography. *Lipids* 36(8): 827-832.
- Pulina, G., Serra, A., Campus, R.L., Papoff, C.M., 1990. - Effetto della grassatura e della concentrazione proteica della razione sulla composizione acidica del grasso del latte di pecore di razza Sarda. pp 427-428 in Proc. 9th Nat. Congr. SIPAOC, Grado (GO), Italy.
- Ramos, M., Juarez, M., 1986. - Chromatographic, electrophoretic and immunological methods for detecting mixtures of milks from different

species. Pages 175-187 in IDF Doc. 202. Int. Dairy Fed, Bruxelles, Belgium.

- Rapetti L., Crovetto G.M., Galassi G., Sandrucci A., Succi G., Tamburini A., Battelli G., 2002. - Effect of maize, rumen-protected fat and whey permeate on energy utilization and milk fat composition in lactating goats. Ital. J. Anim. Sci. 1: 43-53.
- Rotunno, T., Sevi, A., Di Caterina, R., Muscio, A., 1998. - Effects of graded levels of dietary rumen protected fat on milk characteristics of Comisana ewes. Small Ruminant Res. 30: 137-145.
- Rudel L.L., 1997. - Genetic factors influence the atherogenic response of lipoproteins to dietary fat and cholesterol in non human primates. J. Am. Coll. Nutr. 16: 306-312.
- Sacks F.M., Pfeffer M.A., Moye L.A., Rouleau J.L., Rutherford J.D., Cole T.G., Brown L., Warnica J.W., Arnold J.M., Wun C.C., Davis B.R., Braunwald E., 1996. - The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and current events trial investigators. New Engl. J. Med. 335: 1001-1009.
- Salminen I., Mutanen M., Turpeinen A., Griinari M., Aro A., 2001. Proc. 1<sup>st</sup> International Conference on Conjugated Linoleic Acid (CLA). Alesund, Norway. 15.
- Sanders T.A.B., 1998. - Essential and *trans* fatty acids in nutrition. Nutrition Research Reviews, 1: 57-58.
- Sanz-Sampelayo M.R., Perez L., Martin Alonso J.J., Amigo L., Boza J., 2002. - Effects of concentrates with different contents of protected fat rich in PUFAs on the performance lactating Granadina goats. Part II. Milk production and composition. Small Rum. Res. 43: 141-148.
- Schmidely, P., Sauvant, D., 2001. - Taux butyreux et composition de la matière grasse du lait chez les petits ruminants: effets de l'apport de matière grasses ou d'aliment concentré. Prod. Anim. 14: 337-354.

- Secchiari P., Mele M., Serra A., Buccioni A., Antongiovanni M., Ferruzzi G., Paoletti F., Andreotti L., 2001 b. - Conjugated linoleic acid (CLA) content in milk of three dairy sheep breeds. *Prog. Nutr.* 3(4): 37-42.
- Secchiari P., Antongiovanni M., Mele M., Buccioni A., Serra A., Ferruzzi G., 2001a. - Effect of dietary fat on milk fat acidic composition of ewes and cows. *Liv. Prod. Science.* 70: 175.
- Secchiari P., Antongiovanni M., Mele M., Serra A., Buccioni A., Ferruzzi G., Paoletti F., 2001 c. Proceedings of the ASPA XIV Congress. 105-107.
- Secchiari P., Antongiovanni M., Mele M., Serra A., Buccioni A., Ferruzzi G., Paoletti F., Petacchi F., 2003. - Effect of kind of dietary fat on quality of milk fat from italian friesland cows. *Liv. Prod. Sci.* 83: 43-52.
- Secchiari P., Mele M., Serra A., Casarosa L., Andreotti L., 2004. - Effetti del pascolo sul contenuto di CLA e di acido vaccenico nel latte, nel formaggio e nella ricotta di pecore di razza Sarda. Atti 16° Congresso Nazionale SIPAOC, Siena, Italia.324.
- Secchiari P., Mele M., Serra A., Paoletti F., 2001 a. Functional aspects of the lipid fraction in bovine and ovine milk. Proceedings of 3 rd Congress of Eurosafe, Florence, 3-5 October 2001, pp. 503-504.
- Secchiari P., Mele M., Serra A., Paoletti F., 2002. - Le frazioni lipidiche del latte e della carne dei ruminanti. In : Latte e carne dei ruminanti: componente lipidica e salute umana. Atti accademia dei Georgofili, pp. 7-95.
- Sellmayer A., Hrboticky N., Weber P.C., 1999. - Lipids in vascular function. *Lipids*, 34: S13-S17.
- Sinclair H., 1980. - Dietary factors and coronary heart disease. *The Lancet.* 414-415.
- Small D.M., 1991. - The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* 11: 413-434.
- Steijns J.M, 2008. - Dairy products and health: focus on their constituents or on the matrix?. *International dairy journal*, 18: 425-435.

- Sukhija P.S. and Palmquist D.L., 1990. - Dissociation of calcium soaps of long chain fatty acids in rumen fluid. . J. Dairy Sci 73: 1784-1787.
- Taniguchi, M., Utsugi, T., Oyama, K., Mannen, H., Kobayashi, M., Tanabe, Y., Ogino, A., Tsuji, S., 2003. - Genotype of Stearoyl-CoA Desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese black cattle. Mamm. Gen. Gen. Phen. 14: 142-148.
- Thivierge, M.C., Chouinard, P.Y., Levesque, J., Girard, V., Seoane, J.R., Brisson, G.J., 1998. - Effects of buffers on milk fatty acids and mammary arteriovenous differences in dairy cows fed Ca salts of fatty acids. J. Dairy Sci. 81: 2001-2010.
- Todaro, M., Portolano, B., Giaccone, P., 1997. - Variazione della composizione acidica del grasso del latte di pecore alimentate con grassi rumino protetti. Proc. 51st Nat. Congr. SISVet, Bologna, Italy, 51:427-428.
- Toeller M., Buyken A.E., Heitkamp G., Scherbaum W.A., Krans H.M-J., Fuller J.H., 1999. - Eurolab IDDM complication group. Association of fat and cholesterol intake with serum lipid levels and cardiovascular disease: the Eurolab IDDM complication study. Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 107: 512-521.
- Tsiplakou E, Mountzouris K.C., Zervas G., 2006. - Concentration of coniugated linoleic acid grazing sheep and goat milk fat. Livestock science 103, 74-84
- Ulberth F., Henninger M., 1994. - Quantification of *trans* fatty acids in milk fat using spettroscopic and chromatographic methods. J. Dairy Res. 61: 517-527.
- Ulbricht T.L.V. e Southgate D.A.T., 1991. - Coronary heart disease: seven dietary factors. The Lancet 338: 985-992.
- Vance D.E. e Van den Bosch H., 2000. - Cholesterol in the year 2000. Biochimica et Biophysica Acta 1529: 1-8.
- Vernon R.G., Flint D.F., 1988. - Lipid metabolism in farm animals. Proc. Nutr. Soc. 47: 287-293.



- Viviani R., 1970. - Metabolism of long chain fatty acids in the rumen. *Adv. Lipid Res.* 8:267.
- Vlaeminck, B., Dufour, C., van Vuuren, A.M., Cabrita, A.M.R., Dewhurst, R.J., Demeyer, D., Fievez, V. 2005. Potential of odd and branched chain fatty acids as microbial markers: evaluation in rumen contents and milk. *J. Dairy Sci.* 88: 1031-1041.
- Walstra P., 1974. - High-melting triglycerides in the milk fat globule membrane: an artefact? *Neth. Milk Dairy J.* 28: 3-9.
- Walstra P., 1985. - Some comments on the isolation of fat globule membrane material. *J. Dairy Res.* 52: 309-312.
- Walstra P., 1995. - Physical chemistry of milk fat globules. In: Fox P.F. (Ed.), *Advanced dairy chemistry, vol.2, Lipids*, 2<sup>nd</sup> ed., Chapman and Hall, London, 131-178.
- Weksler B.B., 1992. - Piastrine, leucociti, e aterosclerosi: possibili legami fra gli acidi grassi n-3 e protezione dell'aterosclerosi. In De Caterina R., Kristensen S.D., Schmidt E.B. (Eds.). *Fish Oil e Malattia Vascolare*. Bi & Gi Editori – Verona. 47-53.
- Willett W.C., Stampfer M.J., Manson J.E., Colditz G.A., Speizer F.E., Rosner B.A., Sampson L.A., Hennekens C.H., 1993. - Intake of *trans* fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet*, 341, 581-585.
- Williams C., 2000. - Dietary fatty acids and human health. *Ann. Zootech.* 49(3): 165-180.
- Wongtangtintharn S, Oku H, Iwasaki H, Toda T., 2004. - Effect of branched-chain fatty acids on fatty acid biosynthesis of human breast cancer cells. *J Nutr Sci Vitamin.* 50(2):137-143
- Yokoyama S., 2000. - Release of cellular cholesterol: molecular mechanism for cholesterol homeostasis in cell and in the body *Biochimica et Biophysica Acta* 1529: 231-244.
- Yurawecz M.P., Roach J.A.G., Sehat N., Mossoba M.M., Kramer G., Fritsche J., Steinhart H., Ku Y., 1998. - A new conjugated linoleic acid

isomers, 7 *trans*, 9 *cis*-octadecadienoic acid, in cow milk, cheese, beef and human milk and adipose tissue. *Lipids* 33:803-809.

- Zervas, G., Fegeros, K., Koytstolis, K., Goulas, C., Mantzios, A., 1998. - Soy hulls as a replacement for maize in lactating dairy ewe with or without dietary fat supplements. *Anim. Feed Sci. Tech.* 76: 65-75.
- Zomer, A.W.M., van der Burg, B., Jansen, G.A., Wanders, R.J.A., Poll-The, B.T., van der Saag, P.T., 2000. - Pristanic acid and phytanic acid: naturally occurring ligands for the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$ . *J. Lipid. Res.*, 41: 1801-1807.
- Zyriax B.C., Windler E., 2000. - Dietary fat in the prevention of cardiovascular disease- a review. *European Journal Lipid of Science and Tecnology*; 355-365.